



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SCHEILA IRIA KRAUS

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE
COMBRETUM LEPROSUM NO MODELO EXPERIMENTAL DE
NEUROPATIA PERIFÉRICA EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis

2017

Scheila Iria Kraus

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE
COMBRETUM LEPROSUM NO MODELO EXPERIMENTAL DE
NEUROPATIA PERIFÉRICA CAMUNDONGOS**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Róli Rodrigues Simões

Florianópolis

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kraus, Scheila Iria

Potencial terapêutico do extrato etanólico de
Combretum leprosum no modelo experimental de
neuropatia periférica em camundongos / Scheila Iria
Kraus ; orientador, Adair Roberto Soares Dos
Santos, coorientador, Róli Rodrigues Simões, 2017.
72 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Neuropatia periférica.
3. Regeneração nervosa. 4. Plantas medicinais. 5.
Combretum leprosum. I. Dos Santos, Adair Roberto
Soares. II. Simões, Róli Rodrigues. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. IV. Título.

*Este trabalho é dedicado aos meus amados pais, que
jamais mediram esforços para que eu estivesse aqui.
Sem vocês nada disso seria possível!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Universo por me proporcionar a vida e tudo que está contido nela.

Agradeço aos meus pais, Elias e Iria, que mesmo distantes sempre estiveram comigo me apoiando em todas as decisões. Um agradecimento especial a você, mãe, pelas horas gastas no telefone tentando me acalmar em todos os momentos difíceis. Vocês foram e são essenciais em todas as minhas conquistas.

Agradeço a minha irmã, Sueli, por ser como uma segunda mãe (as vezes até mais super protetora), sempre me apoiando, me ensinando e me aconselhando. Agradeço ao meu cunhado Johnny por toda ajuda, e ao meu lindo sobrinho, Joaquim, por proporcionar tantas risadas e momentos felizes. Amo vocês!

Agradeço ao meu namorado, Vicente, por todo companheirismo e compreensão durante essa jornada. Sei que, por muitas vezes, não foi fácil me aturar.

Agradeço ao meu orientador, professor Adair, pela oportunidade que me cedeu em seu laboratório e também por todos os ensinamentos. Esse apoio jamais será esquecido.

Agradeço a minha coorientadora, Róli, pela amizade e por todas conversas, cafés, ensinamentos, palavras de apoio. Você foi e é, sem dúvida, essencial nesta conquista.

Agradeço a todos os demais Landianos (equipe do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação), em especial ao Igor e a Thayza, por todo apoio nos experimentos. Não posso esquecer, é claro, de outras pessoas fundamentais nessa etapa, Gleici, Fernanda, Tassi,

Jheniffer, Carol, Larissa, Bárbara, Fernando, Wellington, Marcos e demais. Vocês formam um time sem igual. Obrigada por tudo!

Agradeço ao seu Carlos e à dona Vilma, pessoas muito especiais que sempre alegam o dia-a-dia, seja com uma conversa ou com um café.

Agradeço à banca que se disponibilizou a ler e contribuir com este trabalho.

Agradeço aos meus companheiros de curso da turma 2013/1. Foi uma honra dividir momentos tão especiais com vocês. Claudia, Pam, Nic, Fernando, Ana Cláudia, Ju Vaz, Ju Marques e demais. Espero que, por muitas e muitas vezes, possamos nos reencontrar, para um café ou uma cerveja, e assim relemburar da nossa época de faculdade. Os desesperos pré-prova, as saídas a campo, os cafés nos intervalos das aulas, as tardes de estudos na BU, os almoços no RU, o brilho nos olhos que tínhamos quando iniciamos a graduação em Biologia na UFSC.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro para a realização da minha experiência como Iniciação Científica. Investir em educação deve se tornar primordial para o nosso país, só assim formaremos cidadãos de bem e dispostos à lutar.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos camundongos que cederam suas vidas em prol do desenvolvimento da Ciência.

Muito obrigada!

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

(Albert Einstein)

"Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante."

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Introdução: Estima-se que a prevalência das neuropatias periféricas seja de aproximadamente 2,4 % da população mundial, e que entre as pessoas com mais de 55 anos esta incidência alcance 8%. Os sintomas mais evidentes decorrentes de neuropatias periféricas incluem a hiperalgesia, a alodínia, e a dor espontânea, as quais surgem como resultado da alteração periférica e central, tanto no tecido neural quanto em estruturas por ele inervadas, como o músculo. Ademais, os pacientes com neuropatia ficam parcial ou totalmente incapacitados, de maneira transitória ou permanente, comprometendo significativamente a qualidade de vida, caracterizando um grande problema de saúde pública. Poucas terapias são conhecidas por prevenir o desenvolvimento da dor neuropática ou influenciar o processo da doença subjacente, devido à proteção ou restauração da função do nervo. Nesse sentido, as plantas medicinais tem sido alvo das mais variadas abordagens terapêuticas. A planta medicinal *Combretum leprosum*, nativa do Brasil, é utilizada popularmente como cicatrizante, sedativo, antitussígeno, expectorante e antiofídico, além de estudos recentes demonstrarem seu potencial analgésico e anti-inflamatório. **Objetivo:** Avaliar o efeito antinociceptivo (analgésico) e neuroregenerador do extrato etanólico de *Combretum leprosum* (EECI) em um modelo experimental de neuropatia periférica em camundongos. **Metodologia:** Após realização de um experimento agudo (nocicepção induzida por glutamato) para constatação da dose eficaz de *Combretum leprosum*, deu-se seguimento a um experimento crônico, que utilizou, como espécie animal, camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas. O procedimento cirúrgico consistiu no esmagamento do nervo ciático e, posteriormente, realizaram-se avaliações para constatar o efeito de *Combretum leprosum* na hiperalgesia mecânica (teste de von Frey), hiperalgesia térmica (teste da placa fria) e efeito neuroregenerador (teste de locomoção). **Resultados:** Os resultados demonstram que, no teste de nocicepção aguda induzida por glutamato, a dose de 300mg/Kg de EECI mostrou-se a mais efetiva (inibição máxima de $59\pm6\%$), no entanto, a dose de 100mg/Kg também foi eficaz (inibição máxima de $47\pm3\%$), seguida da dose de 30mg/Kg (inibição máxima de $28\pm6\%$). Desta forma, para os experimentos subsequentes, decidimos utilizar a dose de 10 e 100mg/Kg, afim de constatar que o efeito é mesmo dependente da dose. No teste da hiperalgesia mecânica foi possível verificar que a dose de 100mg/Kg é capaz de reduzir a frequência de resposta, sendo este

resultado evidente a partir do 7º dia. Em contrapartida, a dose de 10mg/kg não apresentou resultados significantes no mesmo teste. No teste utilizado para verificar a hiperalgesia térmica obtiveram-se resultados semelhantes, uma vez que a dose de 100mg/Kg foi capaz de reduzir a resposta ao estímulo térmico ao frio a partir do 7º dia, enquanto a dose de 10mg/Kg não mostrou bons resultados. No teste locomotor também foi possível identificar um efeito significativo do EECl (100mg/Kg) na recuperação motora dos animais, sendo este resultado evidente a partir do 14º dia após a indução da lesão. Assim sendo, o conjunto de dados obtidos neste trabalho fornecem evidências científicas sobre o potencial analgésico e neuroregenerador de *Combretum leprosum*, bem como possibilidades para o desenvolvimento de novos fitoterápicos.

Palavras-chave: Neuropatia periférica. Regeneração nervosa. *Combretum leprosum*.

ABSTRACT

Introduction: It is estimated that the prevalence of peripheral neuropathies is approximately 2.4% of the world population, and that among people over 55 years this incidence reaches 8%. The most evident symptoms resulting from peripheral neuropathies are hyperalgesia, allodynia, and spontaneous pain, which arise as a result of peripheral and central alteration, both in the neural tissue and in innervated structures such as the muscle. In addition, the patients with neuropathies remain partially or totally incapacitated, in a transient or permanent manner, significantly compromising their quality of life, characterizing a major public health problem. Few therapies are known to prevent the development of neuropathic pain or to influence the underlying disease process due to the protection or restoration of nerve function. In this sense, medicinal plants have been the target of the most varied therapeutic approaches. The medicinal plant *Combretum leprosum*, native of Brazil, is popularly used as cicatrizant, sedative, antitussive, expectorant and antiofidic, in addition to recent studies that demonstrated its analgesic and anti-inflammatory potential effect. **Objective:** Evaluate the antinociceptive (analgesic) and neuroregenerator effect of the ethanolic extract of *Combretum leprosum* (EECI) in an experimental model of peripheral neuropathy in mice. **Methodology:** After an acute experiment (nociception induced by glutamate), performed to define the most effective dose of *Combretum leprosum*, a chronic experiment was carried out using female Swiss mice. The surgical procedure consisted of crushing the sciatic nerve and, later, evaluations were performed to verify the effect of *Combretum leprosum* on mechanical hyperalgesia (von Frey test), thermal hyperalgesia (cold plate test) and neuroregenerator effect (locomotion test). **Results:** The results showed that, in the acute nociception test induced by glutamate, the 300 mg/kg dose of EECI was the most effective (maximal inhibition of $59 \pm 6\%$), however, the dose of 100 mg/kg was also effective (maximal inhibition of $47 \pm 3\%$), followed by the dose of 30 mg/kg (maximal inhibition of $28 \pm 6\%$). Thus, for subsequent experiments, it was decided to use a dose of 10 and 100 mg/kg, in order to verify if the effect is dose-dependent. In the test of mechanical hyperalgesia was found that the dose of 100 mg/kg was able to reduce the frequency of response in von Frey test, being this result evident from day 7. In contrast, the dose of 10 mg/kg presented no significant results in the same test. In the test used to verify the thermal

hyperalgesia, the results obtained were similar, since the dose of 100 mg/kg was able to reduce the response to the thermal stimulus to cold from day 7, while a dose of 10 mg/kg did not show significant results. In the locomotor test it was also possible to observe a significant effect of EECl (100 mg/kg) on the motor recovery of the animals, being this evident result from the 14th day after the induction of the lesion. Thus, the dataset obtained in this work provides scientific evidence on the potential analgesic and neuroregenerative effects of *Combretum leprosum*, as well as the possibilities for the development of a fitotherapic.

Keywords: Neuropathic pain. Nerve regeneration. *Combretum leprosum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das fibras aferentes primárias, atividade elétrica e intensidade da dor.....	25
Figura 2 – Representação da via anatômica da dor.....	26
Figura 3 - Representação esquemática das principais características da dor neuropática.....	29
Figura 4 - Componentes estruturais dos nervos espinais e modelo de lesão nervosa induzida pelo esmagamento do nervo.....	34
Figura 5 - Imagem ilustrativa de um espécime de <i>Combretum leprosum</i>	40
Figura 6 - Nocicepção induzida por glutamato.....	43
Figura 7 - Linha do tempo dos experimentos no modelo de esmagamento do nervo ciático em camundongos.....	44
Figura 8 - Indução da lesão por esmagamento do nervo ciático em camundongos.....	46
Figura 9 - Teste de von Frey.....	47
Figura 10 - Placa Fria.....	48
Figura 11 - Aparato para avaliação da capacidade locomotora.....	49
Figura 12 - Medições do IEC e IFC de um animal falso-operado e um animal lesionado.....	50
Figura 13 - Efeito do tratamento com EECl sobre a nocicepção aguda induzida por glutamato.....	51
Figura 14 - Efeito do tratamento com EECl na hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de esmagamento do nervo ciático.....	53
Figura 15 - Efeito do tratamento com EECl sobre a hiperalgesia térmica induzida pelo modelo de esmagamento do nervo ciático.....	54

Figura 16 - Efeito do tratamento com EECl no déficit motor estático induzido pelo modelo de esmagamento do nervo ciático.....	56
Figura 17 - Efeito do tratamento com EECl no déficit motor dinâmico induzido pelo modelo de esmagamento do nervo ciático.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação Científica da <i>Combretum leprosum</i>	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA – receptor do ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASIC – receptor sensível a ácido (do inglês *Acid-sensing ion channels*)

ATP – Adenosina Trifosfato

AVC – Acidente vascular cerebral

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês, *Brain-derived neurotrophic factor*)

Ca²⁺ – Cálcio

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês, *Calcitonin gene-related polipeptide*)

CTOP – antagonista seletivo do receptor opióide μ

cm – Centímetros

ENC – Esmagamento do Nervo Ciático

EECI – Extrato etanólico de *Combretum leprosum*

EPL – comprimento da pegada da pata lesionada (do inglês, *experimental print length*)

ETS – abertura total dos dedos pata lesionada (do inglês, *total experimental spread of toes*)

PL – comprimento da pegada (do inglês, *print length*)

E.P.M. – Erro Padrão da Média

FO – Falso-operado

g – Grama

GABA – ácido gama-aminobutírico

h – Hora

i.g. – Via Intragástrica

i.p. – Via Intraperitoneal

i.pl. – Via Intraplantar

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain*)

IFC – Índice funcional do ciático

IEC – Índice estático do ciático

IL-1 β – interleucina-1 β

IL-6 – interleucina-6

K⁺ – Potássio

Kg – Quilograma

LANDI – Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação

m/s – Metros por segundo

mg – Miligrama

mL – Mililitro

Nav 1.3 – proteína do canal de sódio tipo 3

Nav 1.8 – Proteína do canal de sódio tipo 8

NF- κ B – Fator nuclear Kappa B

NGF – Fator de crescimento do nervo

NMDA – receptor N-metil D-Aspartato

n° - número

NPL – comprimento da pegada da pata normal (do inglês, *normal print length*)

NTS – abertura total dos dedos da pata normal (do inglês, *total normal spread of toes*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAG – substância cinzenta periaquedutal (do inglês, *Periaqueductal Gray Matter*)

PCPA – p-clorofenilalanina

PGE₂ – Prostaglandina E₂

rAAC – córtex cingulado anterior rostral

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SNRIs – Inibidores da recaptação da serotonina-norepinefrina

SP – Substância P

TCAs – Antidepressivos tricíclicos

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (*Tumor necrosis factor alpha*)

TRPV1 – receptores de potencial transitório da subfamília vaniloide, membro 1

TRPV2 – receptores de potencial transitório da subfamília vaniloide, membro 2

TS – Abertura total dos dedos (do inglês, *total spread of toes*)

TTHL – triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UNIR – Universidade Federal de Rondônia

μ L – Microlitro

μ m – Micrômetro

μ mol – Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

Δ - Delta

κ - Kappa

\geq - Maior ou igual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Dor e Nocicepção	24
1.1.1 <i>Classificação da dor</i>	27
1.2 Dor Neuropática	28
1.2.1 <i>Fisiopatologia da Dor Neuropática</i>	30
1.2.2 <i>Tratamentos para a Dor Neuropática</i>	32
1.3 Modelo Experimental de dor neuropática e regeneração nervosa	33
1.4 Plantas Medicinais	35
1.4.1 <i>Gênero Combretum</i>	36
1.4.2 <i>Combretum leprosum</i>	38
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.3 Objetivos Específicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Extratos padronizados	42
4.2 Animais	42
4.3 Metodologia experimental	43
4.3.1 <i>Nocicepção induzida por glutamato</i>	43
4.3.2 <i>Desenho experimental do modelo de neuropatia periférica</i>	44
4.3.3 <i>Modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC)</i>	44
4.3.4 <i>Hiperalgesia Mecânica - Teste de Von Frey</i>	46

4.3.5 Hiperalgesia Térmica - Teste da Placa Fria.....	47
4.3.6 Avaliação do déficit motor – Índice funcional estático e dinâmico.....	48
4.4 Análise Estatística.....	50
5. RESULTADOS	51
5.1 Efeito do EECl na nocicepção aguda induzida por glutamato.....	51
5.2 O efeito do EECl no modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC): hiperalgesia mecânica.....	52
5.3 O efeito do EECl no modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC): hiperalgesia térmica.....	53
5.4 O efeito do EECl no déficit motor no modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC): índice funcional do ciático estático (IEC).....	55
5.5 O efeito do EECl no modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC): índice funcional do ciático dinâmico (IFC).....	57
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor e Nocicepção

A percepção dolorosa desempenha papéis fisiológicos e adaptativos fundamentais em um organismo saudável, uma vez que atua como mecanismo de alerta, indicando a presença de estímulos nocivos e acionando as respostas protetoras apropriadas (WOOLF; SALTER, 2000; JULIUS; BASBAUM, 2001). Em oposição a alguns sentidos, como a visão e a audição, que dependem da ativação de porções agrupadas do encéfalo, a percepção da dor ocorre através da comunicação entre uma rede de neurônios complexa e adaptativa, responsável por envolver várias áreas encefálicas de uma maneira multidimensional (MELZACK, 2001).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (do inglês, *International Association for the Study of Pain*, IASP) define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão (LOESER; TREEDE, 2008). A partir desta definição pode-se inferir que a dor apresenta um universo multifacetado, o qual envolve componentes sensoriais e emocionais. O componente sensorial, denominado nocicepção, é determinado pela estimulação das fibras aferentes primárias que transmitem o impulso nociceptivo até o sistema nervoso central (SNC), o componente emocional, por sua vez, refere-se às expectativas e/ou experiências prévias do indivíduo, evidenciando seu caráter subjetivo (RUSSO; BROSE, 1998).

O termo nocicepção, derivado de *noci* (do latim, dano ou lesão), é utilizado para descrever os processos de transdução, transmissão e percepção de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo. Tais estímulos podem ser de origem exógena (estímulos mecânicos, químicos e térmicos) ou de origem endógena (isquemia cerebral, por exemplo) (KLAUMANN *et al.*, 2008).

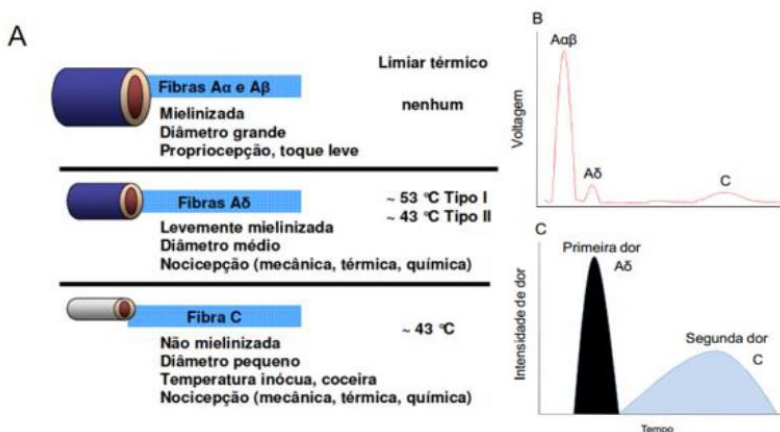
A transdução de um estímulo em um impulso elétrico ocorre em terminais nervosos especializados, os quais são chamados de nociceptores (PISERA, 2005). Estes correspondem às terminações nervosas livres dos neurônios de primeira ordem (sensoriais), cuja função é preservar a homeostasia tecidual, sinalizando assim uma lesão real ou potencial (KLAUMANN *et al.*, 2008). Os neurônios sensoriais podem ser classificados em três grandes grupos, segundo seu calibre (diâmetro), seu grau de mielinização e sua velocidade de condução (Figura 1):

→ Fibras A α /A β : fibras calibrosas ($\geq 10 \mu\text{m}$ de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30-100 m/s). De modo geral, na ausência de dano tecidual, essas fibras são responsáveis por transmitir informações inócuas (como tato, pressão e vibração) (Figura 1 A-C);

→ Fibras A δ : são mielinizadas, com diâmetro (2 a 6 μm) e velocidade de condução intermediários (1,2-30 m/s), essas fibras encarregam-se, principalmente, da modulação da primeira fase da dor (Figura 1 A-C);

→ Fibras C: são fibras de pequeno diâmetro (0,4 a 1,2 μm), não mielinizadas e de velocidade de condução lenta (0,5-2 m/s), responsáveis pela segunda dor ou dor difusa, de queimação persistente (Figura 1 A-C).

Figura 1 - Classificação das fibras aferentes primárias, atividade elétrica e intensidade da dor



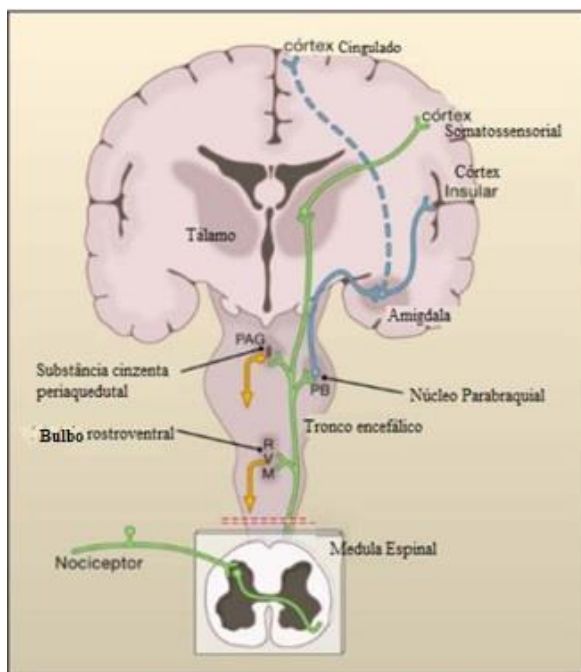
Legenda: (A) - Tipos de fibras aferentes primárias e suas principais características; (B) – Descarga elétrica de fibras nociceptivas; (C) – Relação intensidade X tempo da dor. Fonte: adaptado de Julius e Basbaum, 2001.

As fibras nervosas aferentes primárias projetam-se para o corno dorsal da medula espinal, onde destacam-se estruturas com distinção anatômica e eletrofisiológica, denominadas lâminas de Rexed (BASBAUM; JESSELL, 2000). As fibras A δ , por exemplo, projetam-se para as lâminas I e V (mais profundas) (PURVES *et al.*, 2010). Já os aferentes A β projetam-se para III, IV e V, enquanto as fibras C projetam-se mais superficialmente entre as lâminas I e II (BASBAUM *et al.*, 2009).

Como já mencionado, não existe uma única área cerebral particular para a dor (APKARIAN *et al.*, 2005). Ao invés disso, o estímulo doloroso

pode resultar na ativação de um grupo distribuído de estruturas, as quais podem estar associadas com propriedades sensório-discriminativas (como o córtex somatossensorial), bem como pode relacionar-se com aspectos emocionais (como o giro cingulado anterior e o córtex insular) (Figura 2) (BASBAUM *et al.*, 2009).

Figura 2 – Representação da via anatômica da dor



Legenda: Os nociceptores aferentes primários transmitem informações nocivas aos neurônios de projeção dentro do corno dorsal da medula espinal. Um subconjunto desses neurônios de projeção transmite a informação ao córtex somatossensorial via tálamo, fornecendo informações sobre a localização e a intensidade do estímulo doloroso. Outros neurônios enviam suas projeções ao córtex insular e cingulado através de conexões no tronco encefálico (núcleo parabraquial) e amígdala, contribuindo para o componente afetivo da experiência da dor. Essa informação ascendente também acessa neurônios do bulbo rostral e substância cinzenta periaquedutal para acionar sistemas de *feedback* descendentes que regulam a saída da medula espinal. Fonte: adaptado de Basbaum *et al.*, 2009.

Importante salientar que, além das vias ascendentes da dor, nosso organismo também possui mecanismos descendentes, os quais visam suprimir as aferências nociceptivas, modificando a experiência dolorosa. A modulação (facilitação ou inibição) da dor compreende um circuito complexo de aferências em múltiplas áreas, incluindo o hipotálamo, a amígdala, o córtex cingulado anterior rostral (rAAC), a substância cinzenta periaquedutal (PAG), o bulbo, dentre outros (MILLAN, 2002; YOSHIMURA; FURUE, 2006). Os principais moduladores que atuam no processo descendente da dor consistem no sistema opiodérgico, noradrenérgico, GABAérgico, dopaminérgico, adenosinérgico, além de canabinóides endógenos (MILLAN, 2002). Os mecanismos pelo quais cada substância atua são bastante complexos. A noradrenalina, serotonina e dopamina, por exemplo, exercem papéis duais na nocicepção, uma vez que dependem do tipo de receptor envolvido, do sítio (local) de ação, bem como da comunicação cruzada (*cross talk*) entre a sinalização neuroquímica local e as vias descendentes (MILLAN, 2002).

1.1.1 Classificação da Dor

A dor pode ser classificada de diversas maneiras, no entanto, de forma didática, ela é organizada de acordo com a sua duração e origem. Com relação à duração é, geralmente, diferenciada em aguda ou crônica: a) **Dor Aguda:** é relacionada, temporalmente, à lesão causadora. É decorrente de uma ativação direta dos nociceptores após um estímulo nocivo (traumas, intervenções cirúrgicas, reações inflamatórias, dentre outros) e surge como um sinal de alerta (LOESER; MELZACK, 1999). Sua duração pode ser extremamente curta, desde alguns minutos até algumas semanas, no entanto, decorrido esse tempo, ela passa a caracterizar-se como dor crônica (TEIXEIRA; FIGUEIRÓ, 2001).

b) Dor Crônica - É referida como uma dor que perdura por mais de 3 meses, ou que ultrapassa o período usual de recuperação esperado para a causa desencadeante da dor (alguns consideram esse limite como sendo de 6 meses) (TEIXEIRA; FIGUEIRÓ, 2001). A dor crônica não apresenta utilidade a qualquer processo fisiológico e, desta forma, não assume qualquer outra função senão a de causar sofrimento ao indivíduo, em seu aspecto mais amplo: físico, emocional e financeiro. É gerada por impulsos de pequena magnitude produzidos por atividade neural anormal e pode estar associada com a continuação da patologia ou persistir após a recuperação da doença ou lesão (LOESER; MELZACK, 1999).

Considerando a origem (mecanismos desencadeantes) a dor pode ainda ser dividida em nociceptiva, neuropática e psicogênica:

a) Dor nociceptiva: Origina-se da ativação de nociceptores, que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e/ou químicos. Quando há uma resposta inflamatória, ela é iniciada logo após a lesão tecidual, bem como após o reconhecimento do sistema imunológico de um agente estranho ao organismo ou ainda pela percepção de estruturas próprias como sendo não-próprias (doenças autoimunes) (KLAUMANN *et al.*, 2008).

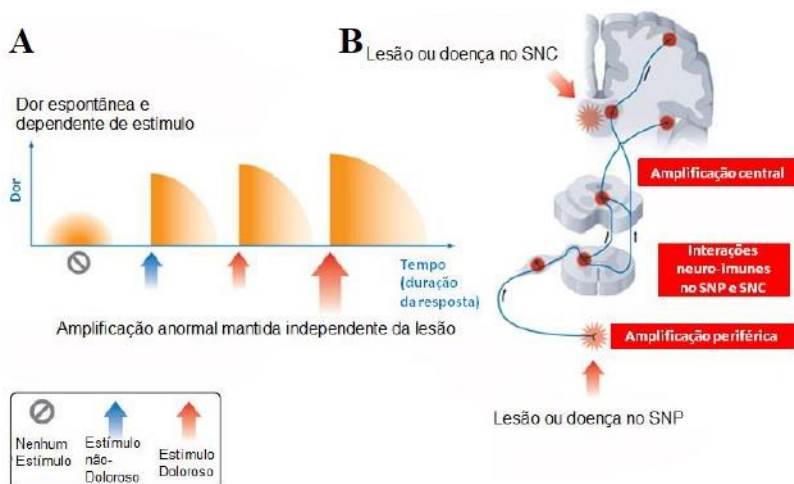
b) Dor neuropática: consequência direta de uma lesão nervosa ou de uma doença que afete o sistema somatosensorial, seja em nível periférico ou central. Pode ser de duração aguda ou crônica, intermitente ou episódica (ver detalhes na secção 1.2) (LOESER; TREEDE, 2008).

c) Dor psicogênica: Está relacionada à prevalência de fatores psicológicos na gênese do processo doloroso (MERSKEY, 1986 ; FÜRST, 1999).

1.2 Dor Neuropática

A dor neuropática é um tipo específico de dor, geralmente crônica, causada por uma lesão ou doença no sistema somatosensorial, podendo ser de origem central ou periférica (LOESER; TREEDE, 2008). Esta condição pode resultar de uma grande gama de patologias e disfunções que incluem trauma, inflamação, doenças metabólicas (como por exemplo, a diabetes), infecções (como a herpes zoster), tumores e doenças neurológicas primárias (Parkinson, por exemplo) (BOUHASSIRA *et al.*, 2008). Os sintomas compreendem a hiperalgesia (aumento da responsividade ao estímulo nocivo), a alodínia (resposta dolorosa ao estímulo inócuo), e a dor espontânea (dor na ausência de estímulo) (JI; WEN, 2006). Tais indícios surgem em decorrência da sensibilização periférica e central, caracterizando-se por mudanças plásticas que modificam o desempenho da via nociceptiva, aumentando e prolongando a resposta aos estímulos periféricos (Figura 3) (COSTIGAN *et al.*, 2009).

Figura 3 - Representação esquemática das principais características da dor neuropática



Legenda: Representação esquemática das principais características da dor neuropática. No painel A podem-se observar os principais sintomas da dor neuropática: dor espontânea; alodínia e hiperalgesia, nesta ordem. No painel B observa-se, principalmente, as origens da dor neuropática, que podem ser em decorrência de uma lesão ou doença no SNC ou no SNP. Fonte: adaptado de Costigan *et al.*, 2009.

Com relação à prevalência, estima-se que cerca de 2,4% da população mundial seja acometida por neuropatias periféricas e, que entre as pessoas com mais de 55 anos, esta incidência alcance os 8% (ENGLAND; ASBURY, 2004; MARTYN; HUGHES, 1997). No Brasil, a dor crônica é uma condição clínica muito frequente, acometendo entre 28 e 41% da população (POSSO *et al.*, 2016). Um estudo de Moraes (2012) demonstrou que, dentre 1597 brasileiros que responderam o questionário DN4 (do inglês, *Douleur Neuropathique 4 Questions*), 42% apresentaram indícios de dor crônica, sendo que, destes, 10% tiveram dor crônica com características neuropáticas, percentual maior que Reino Unido (8%) e França (6,9%).

Como consequência, a dor neuropática leva a um decréscimo na qualidade de vida dos indivíduos e também a gastos excessivos do sistema público de saúde com o tratamento destas disfunções. Nos Estados Unidos, é estimado que o custo anual do tratamento de um paciente com

dor neuropática periférica pós-traumática ou pós-cirúrgica é de aproximadamente 5 mil dólares, sendo que os custos indiretos ao tratamento podem alcançar até aproximadamente 27 mil dólares anuais (SCHAEFER *et al.*, 2014).

1.2.1 Fisiopatologia da Dor Neuropática

A fisiopatologia da dor neuropática inclui um sistema complexo de geradores neurais, circuitos e mediadores químicos nos quais a comunidade científica está focando o entendimento. As alterações neuroanatômicas em resposta à lesão consistem de mecanismos adaptativos periféricos e centrais, os quais são variados e incluem mudanças tanto nos sistemas pró-nociceptivo como antinociceptivo (DEVOR *et al.*, 2014). A sensibilização periférica é um dos primeiros indícios observados após uma lesão nervosa periférica, e consiste na ativação ou sensibilização dos nociceptores por meio de mediadores inflamatórios (como exemplo, o glutamato, a bradicinina, a histamina, a substância P e outros). Nesse processo são observados a redução no limiar de ativação e o aumento da excitabilidade da membrana na célula sensorial. A diminuição do limiar frente a estímulos térmicos e mecânicos também é comum em pacientes com lesões em nervos espinais (FIELDS *et al.*, 1998). A sensibilização central, por sua vez, refere-se à um estado de hiperexcitabilidade que é estabelecido no SNC, conduzindo a um aumento nos sinais nociceptivos (WOOLF, 2000). Nesse processo há o envolvimento de vários moduladores sinápticos, como aminoácidos excitatórios, alterações na cinética e propriedades dos canais iônicos, aumento na densidade de receptores ionotrópicos e ativação de cinases pré e pós-sinápticas. Em casos de dor neuropática, a sensibilização central é desencadeada pela atividade contínua dos nervos lesionados (COSTIGAM *et al.*, 2009).

Um dos principais mecanismos responsáveis pela dor neuropática é a geração de potenciais de ação ectópicos em diversos locais das vias nociceptivas, os quais incluem o neuroma, o corpo celular no gânglio da raiz dorsal (GRD), bem como os neurônios aferentes vizinhos não lesionados (CAMPBELL *et al.*, 1988). O aumento da atividade ectópica espontânea é acompanhado por um aumento da expressão do RNA mensageiro de genes que codificam canais de sódio, como o Nav1.3 (proteína do canal de sódio tipo 3) e Nav1.8 (proteína do canal de sódio tipo 8), nos neurônios aferentes primários. O Nav1.3 é um canal de sódio que, após lesão nervosa, torna-se bastante expressivo em neurônios

sensoriais, desempenhando papel significativo no aumento da excitabilidade neuronal e contribuindo para a dor neuropática (WOOD *et al.*, 2004). O Nav1.8, por sua vez, está envolvido na abertura de canais de sódio em condições fisiopatológicas da dor, sugerindo, desta maneira, que os canais de sódio podem auxiliar em terapias farmacológicas que envolvam situações neuropáticas (LAI *et al.*, 2003).

Além disso, a sensibilização exacerbada dos nociceptores, observada em processos de dor neuropática, também se deve, em parte, à atividade espontânea patológica de fibras não-mielinizadas do tipo C e de neurônios aferentes primários pouco mielinizados com fibras do tipo Aδ. Esses neurônios respondem, usualmente, em casos de estímulos potencialmente nocivos, entretanto, após uma lesão nervosa periférica, observa-se uma sensibilidade anormal, a qual é sustentada por intensas alterações celulares e moleculares a nível dos nociceptores aferentes primários (BARON, 2006).

Outro mecanismo importante, que atua na modulação da dor neuropática, é definido como sensibilização central, processo que ocorre por meio de interações neuroimunes. A degeneração Walleriana, observada após lesões do sistema nervoso periférico, é responsável pela ativação e recrutamento de vários tipos de células para o local da lesão, incluindo mastócitos, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos e células de Schwann. Estas células são responsáveis por liberar adenosina trifosfato (ATP), prostaglandinas, fator de crescimento do nervo (NGF) e citocinas pró-inflamatórias, tais como: fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6); estes mediadores interagem com o neurônio lesionado e outras fibras não lesionadas, diminuindo o seu limiar de ativação (COSTIGAN, 2009; JULIUS; BASBAUM, 2001).

O mecanismo glutamatérgico também exerce papel fundamental em processos de sensibilização central. O glutamato, liberado em excesso na medula espinal, bem como as interações neurônio-glia através de citocinas quimiotáticas (como exemplo a fractalkina) e outros moduladores são responsáveis por promover a ativação das células gliais (micróglia e astrócitos). Uma vez ativadas, essas células contribuem para o desenvolvimento e manutenção da dor neuropática (WATKINS *et al.*, 2001). Elas atuam produzindo a liberação de diversas substâncias (como por exemplo, TNF- α , IL-1 β e IL-6), e a consequente ativação de astrócitos e neurônios vizinhos (MARCHAND *et al.*, 2005; MILLIGAN; WATKINS, 2009).

Assim, os sinais neuroexcitatórios e neuromodulatórios liberados pelas células gliais (tais como Substância P, aminoácidos excitatórios e ATP) ou aqueles nos quais as células gliais expressam receptores, desempenham papel fundamental em estados de dor neuropática (MARCHAND *et al.*, 2005). A excitabilidade dos neurônios responsivos à estímulos nocivos aumenta rapidamente em resposta a exposição a estes produtos gliais, os quais apresentam efeitos diretos em neurônios (BESSON, 1999). O aumento do Cálcio (Ca^{2+}) intracelular, após uma lesão nervosa, leva à subsequente ativação das vias de p38, MAPK e ERK na microglia. A atividade destas vias promove o aumento de vários fatores de transcrição, como o NF- κ B e a secreção de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e Prostaglandina E₂ e de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF).

O possível mecanismo pelo qual as citocinas pró-inflamatórias liberadas contribuem para a dor, é por atuarem em seus receptores expressos em neurônios de segunda ordem e/ou em células gliais em regiões responsivas à dor na medula espinal, e a ativação destes receptores leva a proliferação celular, remodelamento da matriz extracelular e, consequentemente, maior liberação de mediadores pró-inflamatórios (HAN *et al.*, 2001). Por exemplo, o TNF- α e a IL-1 β liberados por astrócitos aumentam a excitabilidade neuronal e a força sináptica por aumentar a condutividade dos receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA, bem como, por aumentar o número destes receptores na membrana dos neurônios (STELLWAGEN; MALENKA, 2006). Além disso, a IL-1 β é responsável por aumentar o influxo de íons Ca^{2+} através dos receptores NMDA em neurônios da medula espinal (VIVIANI *et al.*, 2003).

1.2.2 Tratamentos para a Dor Neuropática

O tratamento da dor neuropática têm sido um grande desafio, tanto no âmbito clínico quanto no pré-clínico. Inicialmente, três abordagens são possíveis: tratamento preventivo, tratamento da causa e tratamento sintomático. No entanto, são raras as abordagens conhecidas por prevenir o desenvolvimento da dor ou influenciar no processo subjacente, protegendo ou restaurando a função nervosa. Assim sendo, torna-se frequente o tratamento sintomático e da incapacidade (FINNERUP, 2014).

Com relação aos medicamentos de primeira linha para a dor neuropática, encontram-se os antidepressivos tricíclicos (TCAs), os inibidores da recaptação da serotonina-norepinefrina (SNRIs), a

gabapentina e a pregabalina. Contudo, sabe-se que mesmo essas drogas com eficácia estabelecida apresentam resultado limitado, o que pode estar relacionado com a demarcação da dose e o expressivo número de efeitos colaterais, que implicam diretamente na qualidade de vida do paciente (DWORKIN, 2007).

O uso de analgésicos opioides também mostrou certa eficácia em alguns pacientes acometidos pela dor neuropática, no entanto, há contraindicações específicas quanto ao seu uso, principalmente devido ao abuso e tolerância. Da mesma forma, o uso de canabinóides requer cuidados, uma vez que constataram-se efeitos secundários preocupantes, além de problemas com questões legais e regulamentares (FINNERUP, 2014).

Diante deste cenário, torna-se de extrema importância o estudo de novas terapias e medicamentos para a prevenção, controle e resolução da dor neuropática, possibilitando melhoras significativas na vida do indivíduo acometido.

1.3 Modelo Experimental de dor neuropática e regeneração nervosa

A busca por estratégias que favoreçam a regeneração de nervos espinais e, concomitantemente, aliviem os sintomas da dor neuropática têm sido motivo de muitos estudos dentro da neurociência e da farmacologia. Neste contexto, muitos modelos experimentais são utilizados para aumentar o conhecimento sobre a regeneração nervosa e o desenvolvimento de terapias que promovam uma adequada recuperação funcional.

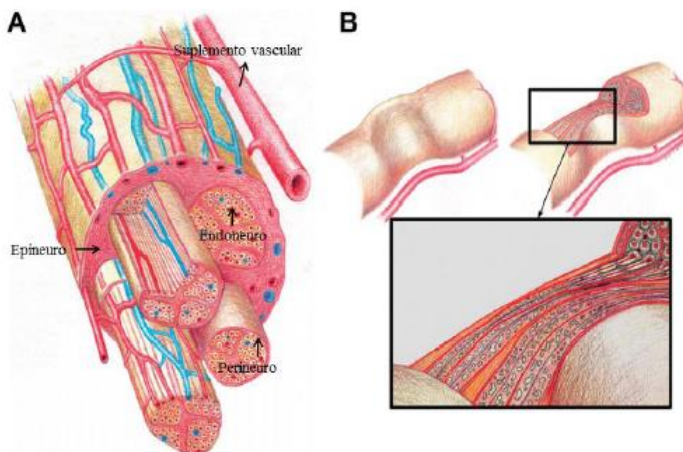
O modelo experimental de neuropatia periférica utilizado neste trabalho é a lesão por esmagamento do nervo ciático de camundongos do tipo axonotmese (Figura 4B). Neste modelo não há rompimento total do tronco nervoso, permitindo que se estude além da dor neuropática, a regeneração nervosa e a recuperação funcional (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004).

Tal lesão desencadeia uma série de eventos induzidos pela lesão axonal (reação axonal), os quais iniciam nos neurônios sensoriais e motores, no local e distalmente à lesão. O processo, chamado degeneração Walleriana distal, é responsável por promover a recuperação do segmento, favorecendo um ambiente celular e molecular apropriado para o processo de regeneração axonal após a lesão (IDE, 1996). A degeneração Walleriana que ocorre após o esmagamento do nervo é um processo lento, no entanto, neste modelo, o crescimento axonal é

consideravelmente mais rápido se comparado à lesões que resultam na descontinuidade anatômica do nervo, conhecidas como neurotinese. Estima-se que há um período de latência de 1 a 2 dias para que se inicie o processo de regeneração axonal em uma taxa constante (LUNN *et al.*, 1990).

As lesões traumáticas experimentais que utilizam o nervo ciático de roedores (principalmente ratos e camundongos) são amplamente utilizadas na pré-clínica, uma vez que a anatomia e constituição tecidual do nervo destes animais é bastante similar ao nervo de humanos, exceto pelo tamanho e densidade de tecido conjuntivo (Figura 4A) (MACKINNON *et al.*, 1985). Assim, o modelo de esmagamento do nervo ciático apresenta-se como uma ferramenta apropriada para o estudo de terapias que auxiliem na regeneração do nervo, bem como no alívio dos sintomas da dor neuropática.

Figura 4 – Componentes estruturais dos nervos espinais e modelo de lesão nervosa induzida pelo esmagamento do nervo



Legenda: (A) componentes estruturais dos nervos espinais, e a sua divisão em três compartimentos contidos por tecido conjuntivo: o endoneuro, o perineuro e o epineuro. (B) lesão axonal por esmagamento do nervo (axonotmese), do segmento distal ao centro da lesão aparece o processo de degeneração Walleriana. Fonte: Desenhado por Scott Rogers, em Zochodne (2008) *apud* Bobinski (2015).

1.4 Plantas Medicinais

A utilização de plantas para fins medicinais, no tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Apesar dos avanços da medicina moderna na última década, as plantas ainda possuem uma importante contribuição na saúde mundial (CALIXTO, 2000). Isso se deve, em parte, aos dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), que afirmam que 80% da humanidade, que vive em países em desenvolvimento, ainda não têm acesso ao atendimento primário de saúde. Os motivos incluem a distância dos centros médicos e falta de recursos para a aquisição dos medicamentos prescritos. Para essa população, as terapias alternativas são as principais formas de tratamento, e as plantas medicinais, os principais medicamentos (AKERELE, 1993).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em sua resolução de nº 26, de 13 de maio de 2014, define planta medicinal como “toda espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos”. Deste modo, pode-se inferir que a diferença entre planta medicinal e fitoterápico reside na elaboração da planta para uma formulação específica, uma vez que, ainda de acordo com essa resolução, a definição de fitoterápico consiste em:

“Todo e qualquer produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal.”

Não é considerado medicamento fitoterápico aquele que inclua, em sua composição, substâncias ativas ou altamente purificadas, sejam elas sintéticas, semissintéticas ou naturais. Nesse caso encontra-se o fitofármaco, que por definição “é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais, ou mesmo, a mistura de substâncias ativas de origem vegetal” (VEIGA Jr. *et al*, 2005).

O Brasil é detentor da maior diversidade genética de plantas do mundo, possuindo cerca de 55 mil espécies catalogadas (de um total estimado entre 350 a 550 mil), e conta com a ampla tradição do uso das plantas medicinais vinculada ao conhecimento popular transmitido entre

gerações. No entanto, apesar da riqueza da flora brasileira, nos últimos 20 anos, o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido apenas 8% anualmente (FONSECA, 2012).

Com relação ao uso de plantas medicinais para fins terapêuticos, algumas estimativas indicam que, em países como a China, cerca de 30-50% das drogas consumidas são de origem vegetal. Na Europa e América do Norte 50% da população já fez uso de fitoterápicos. Na Alemanha destaca-se um índice de 90% de uso de formas farmacêuticas contendo algum componente de origem vegetal. No Brasil, estudos demonstram que, em média, 60% da população utiliza alguma medicação baseada em conceitos de medicina fitoterápica ou alternativa, como homeopatia e florais de Bach (BRASIL, 2001).

Todavia, considerando o exposto, sabe-se que ainda é comum o consumo de plantas medicinais com pouca ou nenhuma comprovação de seu potencial farmacológico, tornando-se de extrema importância estudos científicos que permitam a confirmação de sua efetividade, qualidade e segurança (VEIGA Jr *et al.*, 2005).

1.4.1. Gênero *Combretum*

A família de plantas Combretaceae é encontrada amplamente distribuída em todo mundo. Ela possui 18 gêneros conhecidos, dos quais o maior é o *Combretum*, que apresenta aproximadamente 370 espécies. O gênero *Combretum* é encontrado em diversas regiões da África, onde, por muitas vezes, constitui o gênero com as espécies mais abundantes (ROGERS; VEROTTA, 1996). Em geral, seu aspecto é variado, incluindo principalmente árvores, arbustos ou trepadeiras (McGAW *et al.*, 2001).

O uso dessas plantas como alternativa medicinal é bastante comum no sul da África. Elas são geralmente empregadas sob a forma de decoctos ou infusões (planta seca ou, mais raramente, folhas frescas), para o tratamento de inúmeras doenças, tais como diarreia, conjuntivite, gripes e resfriados, pneumonia, lepra, sífilis, gonorreia, febre, hipertensão, edema e até mesmo para a infertilidade nas mulheres. Seu uso também se dá na intervenção dos mais diversos tipos de dores, como abdominais, nas costas, ouvido, dente e cabeça. Adicionalmente, essas espécies são utilizadas, de forma tópica, para a cura de feridas e infecções na pele (como em mordidas de cobras e escorpiões) na condição de pomadas constituídas de matéria vegetal seca (FYHRQUIST, 2007; McGAW *et al.*, 2001, VAN WYK *et al.*, 1997). Os frutos são raramente aproveitados,

devido à sua toxicidade relatada para humanos (ROGERS; VEROTTA, 1996).

Vários estudos têm evidenciado as propriedades antimicrobianas, citotóxicas e antiproliferativas referentes aos extratos e também aos compostos isolados do gênero *Combretum*. Angeh *et al.* (2007) demonstraram que triterpenos isolados do extrato das folhas de *Combretum imberbe* apresentam atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de atividade anti-inflamatória, antiproliferativa e citotóxica contra células das linhagens K-562, L-929 e HeLa. Katerere *et al.* (2003) também demonstraram, em seu trabalho, que quatro triterpenos pentacíclicos isolados das folhas de *C. imberbe* apresentam atividade antimicrobiana e, particularmente, o ácido imbérbico é responsável por potente atividade contra o *Mycobacterium fortuitum* e o *Staphylococcus aureus*.

Além disso, verificou-se que a espécie *Combretum erythophyllum* também apresenta atividade antimicrobiana, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Essa atividade parece estar relacionada aos flavonoides encontrados na planta, dos quais destacam-se a apigenina, genkwanina, 5-hidroxi-7,7-metoxiflavona, rhamnocitrina, kaemferol, quercetina-5,3-dimetiléter e rhamnazinae (MARTINI; ELOFF, 1998).

Outro estudo demonstrou que o ácido mólico, um glicosídeo isolado de *Combretum molle*, foi capaz de, em ratos, causar bradicardia, hipotensão e vasodilatação dependente do endotélio. Além disso, dados adicionais revelaram que o composto apresenta atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos de edema de pata, contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste de placa quente (OJEWOLE, 2008 a.b.).

Olajide *et al.* (2003) também comprovou a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico das folhas de *Combretum micranthum*, nas doses de 50 e 100mg/Kg, no modelo de edema de pata induzido por carragenina e, além disso, nas mesmas doses, houve inibição do aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético; a dose de 100mg/Kg foi capaz de inibir a formação de granuloma em ratos de forma similar a indometacina (5mg/Kg). Além disso, outras espécies foram conhecidas por apresentar atividade anti-inflamatória, como: *C. apiculatum*, *C. mossambicense* e *C. imberbe* (McGAW, 2001).

Estudos fitoquímicos têm sido realizados com diferentes espécies do gênero *Combretum*, e os resultados demonstram uma grande variedade de compostos químicos bioativos, são alguns exemplos: taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas, triterpenos, glicosídeos e derivados de

fenantreno (FYHRQUIST, 2007). Tais conhecimentos revelam importantes evidências para o uso terapêutico de plantas do gênero *Combretum*, no entanto, para garantir a efetividade e segurança dos produtos, ainda são necessários mais estudos.

1.4.2 *Combretum leprosum*

Uma das espécies do gênero *Combretum*, encontrada no Brasil, nos estados do norte e nordeste, caatinga e pantanal matogrossense é a *Combretum leprosum* Mart. Esta planta foi catalogada pelo botânico alemão Carl Friedrich Philipp von Martius, em 1867, e trata-se de arbusto conhecido popularmente como mofumbo, cipoaba ou carne-de-vaca (Figura 5) (FACUNDO, 1993).

Na medicina popular é frequente o uso de *C. leprosum*, principalmente sob a forma de infusões preparadas com as partes aéreas (tronco, folhas e flores) e raízes, as quais são utilizadas como cicatrizante, para o tratamento de hemorragias, como sedativo (FACUNDO *et al.*, 2005), antitussígeno, expectorante (AGRA *et al.*, 2007) e antiofídico (FERNANDES *et al.*, 2007).

Estudos envolvendo as folhas e as raízes de *Combretum leprosum*, demonstraram que, a partir destes materiais, foi possível isolar o ácido arjunólico, o ácido mólico, ácidos graxos, o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL), flavonoides glicosilados 3-O-metilquercetina e quercetina. A análise do extrato etanólico das folhas inferiu que os monossacarídeos são os principais componentes (correspondem a 80%), os triterpenos representam 10% (entre eles o TTHL), além de 5% de oligossacarídeos e 3% de ácidos graxos (FACUNDO *et al.*, 1993; 2005).

Medeiros *et al.* (2003) demonstraram que tanto o extrato etanólico da raiz de *C. leprosum* quanto o ácido arjunólico, reduziram o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Além disso, verificou-se que o extrato hidroalcoólico da casca desta espécie, administrado pela via oral (v.o.), apresenta atividade ansiolítica e, administrando-se pela via intraperitoneal (v.i.), apresenta atividade depressora central e relaxante muscular (ALMEIDA *et al.*, 2003). No mesmo ano, Meneses *et al.* (2003) constataram ainda que o extrato etanólico das cascas da planta apresentam atividade protetora da mucosa gástrica, quando avaliado no modelo de úlcera induzida pela indometacina.

Em 2005, Facundo *et al.* verificaram que o extrato das raízes de *C. leprosum* é capaz de inibir a atividade das enzimas butiril e acetilcolinesterases. Adicionalmente, constatou-se que o extrato das frutas de *C. leprosum* reduz a atividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararacussu*, bem como a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca*, resultados estes que corroboram com uso popular desta planta como antiofídico (FERNANDES *et al.*, 2007).

Segundo Horinouchi *et al.* (2013), tanto o extrato etanólico quanto o TTHL obtidos das flores de *C. leprosum* possuem potente atividade anti-inflamatória quando administrados por via tópica, uma vez que foram capazes de inibir o edema e a migração celular em processos inflamatórios na pele. Além disso, Longhi-Balbinot *et al.* (2009, 2011) demonstraram que o TTHL, administrado por via intragástrica, foi capaz de promover uma redução significativa da nocicepção induzida pelo ácido acético, pela formalina (na primeira e na segunda fase), e pelo glutamato, administrado centralmente (via intratecal) e periféricamente (via intradérmica). Acredita-se que o efeito antinociceptivo do TTHL é, em parte, devido ao envolvimento do sistema opioide e serotoninérgico, uma vez que foi revertido pela naloxona (antagonista não seletivo de receptores opioides), CTOP (antagonista seletivo de receptores μ -opioide), norbinaltorfimina (antagonista seletivo de receptores κ -opioide), naltrindol (antagonista seletivo de receptores δ -opioide), PCPA (p-clorofenilalanina, inibidor da síntese de serotonina), WAY100635 (antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}) e cetanserina (antagonista seletivo de receptores 5-HT₂). Além disso, demonstrou-se que a antinocicepção causada pelo TTHL envolve a ativação da proteína Gi e abertura de alguns canais de potássio (K⁺), como os dependentes de ATP, os dependentes de voltagem e os de alta condutância operados por Cálcio (Ca²⁺), tendo em vista que seu efeito foi bloqueado pela toxina pertussis, glibenclamida, tetraetilamônio e caribdotoxina, respectivamente. Adicionalmente, a administração de TTHL por via intragástrica promoveu importante efeito anti-inflamatório em camundongos (LONGHI-BALBINOT *et al.*, 2012).

Estudos prévios do nosso laboratório de pesquisa também verificaram que o extrato hidroalcoólico obtido das flores de *Combretum leprosum* foi responsável por promover um efeito antinociceptivo em diversos testes de nocicepção química e térmica. Ainda neste estudo, demonstrou-se que o TTHL apresentou efeito antinociceptivo no teste de nocicepção induzida pelo glutamato (PIETROVSKI *et al.*, 2006). Outros resultados, obtidos também por nosso grupo, constatarem importante efeito

antinociceptivo do extrato das inflorescências de *C. leprosum* no modelo de dor pós-operatória. O extrato também apresentou efeito no comportamento tipo-depressivo de camundongos, verificado através do teste de suspensão pela cauda (dados ainda não publicados).

Tabela 1 – Classificação científica de *Combretum leprosum*

Classificação Científica	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta (Angiosperma)
Classe	Magnoliopsida (Dicotiledônea)
Ordem	Myrtales
Família	Combretaceae
Gênero	<i>Combretum</i>
Espécie	<i>C. leprosum</i>

Legenda: Classificação científica de *C. leprosum*. Fonte: Re flora, 2017.

Figura 5 – Imagem ilustrativa de um espécime de *Combretum leprosum*



Legenda: Representação fotográfica de *C. leprosum*. Fonte: Re flora, 2017.

2. JUSTIFICATIVA

A dor está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam os consultórios brasileiros por motivos diversos, sendo razão para as consultas médicas em um terço dos casos (ROCHA *et al.*, 2007). Apesar das sensações dolorosas serem um alerta do qual o organismo se utiliza para sinalizar um processo de agressão, a problemática da dor acompanha a humanidade na medida em que interfere na homeostasia do indivíduo e da sua relação com os outros (PIRES, 2007). Atualmente, pesquisas são realizadas no intuito de elucidar os mecanismos fisiológicos e emocionais da dor, visando a descoberta de novos fármacos que possam reduzir ou

até eliminar o processo doloroso. A dor neuropática está entre os mais difíceis tipos de dor crônica para tratar, isso em decorrência de sua complexidade etiológica e o envolvimento de muitos sistemas de neurotransmissores, receptores, canais iônicos e tipos celulares (JAIN, 2008, TRUINI *et al.* 2013).

As abordagens farmacológicas da dor crônica são um desafio no âmbito clínico (DWORKIN *et al.*, 2007) e, atualmente, não dispomos de medicamentos que possam efetivamente aliviar a dor neuropática e atuar no processo subjacente de regeneração nervosa, utilizando, desta forma, apenas tratamentos paliativos (BORSOOK, 2012).

Neste sentido, torna-se de interesse a utilização de produtos à base de plantas medicinais, uma vez que podem auxiliar ou substituir as terapias convencionais, aumentando a acessibilidade, além de, possivelmente, reduzir os custos e efeitos adversos (CALIXTO, 2000). A planta medicinal *Combretum leprosum* apresenta-se como uma alternativa para o tratamento dos mais variados tipos de dor e de doenças, devido a sua variedade de compostos e possibilidades de atuação no organismo. Frente a este cenário, a busca por elementos que comprovem a eficácia, qualidade e segurança de produtos que envolvam a *C. leprosum* torna-se necessária, visando, assim, o desenvolvimento de novos fitoterápicos para o tratamento da dor neuropática e a promoção da regeneração nervosa.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antinociceptivo (analgésico) e neuroregenerador do extrato etanólico de *Combretum leprosum* (EECI) em um modelo experimental de neuropatia periférica em camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

- i) Identificar a dose analgésica de EECl a partir do modelo de nocicepção aguda induzida por glutamato;
- ii) Verificar o efeito analgésico do EECl na hiperalgesia mecânica, decorrente do modelo de neuropatia periférica;
- iii) Analisar o efeito analgésico do EECl na hiperalgesia térmica, decorrente do modelo de neuropatia periférica;

- iv) Constatar o potencial efeito neuroregenerador do EECI no modelo de neuropatia periférica;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Extratos padronizados

A obtenção do extrato etanólico foi conseguida através das partes aéreas (inflorescências) de *Combretum leprosum*. As etapas de coleta, extração e preparo foram realizadas pela equipe do prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti, pertencente ao Departamento de química da Universidade Federal Santa Catarina (UFSC) e pelo prof. Dr. Valdir Facundo, pertencente ao Departamento de química da Universidade Federal de Rondônia (UNIR). A diluição do extrato etanólico de *C. leprosum* (EECI) foi realizada em nosso laboratório, por meio de uma solução de 3% de Tween 20 e 97% de solução salina 0,9%. A mistura obtida foi administrada aos animais por via intragástrica (i.g., gavagem), duas vezes ao dia (pela manhã [8:00h] e no final da tarde [18:00h]).

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) Swiss (30 a 40 g, 8 a 10 semanas) fêmeas fornecidas pelo Biotério Central da UFSC. Os camundongos foram mantidos em câmaras isoladas contendo no máximo 5 animais por caixa, com ventilação, sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (60 - 80%), em ciclos de 12 horas claro-escuro (6:00 às 18:00 horas), além de livre acesso a água filtrada (filtro Jojaco® para coliformes fecais e metais pesados) e ração (BioBase para roedores). Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para o estudo com os animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983) e aprovados pelo Comitê de ética da UFSC (Protocolo 2600250816).

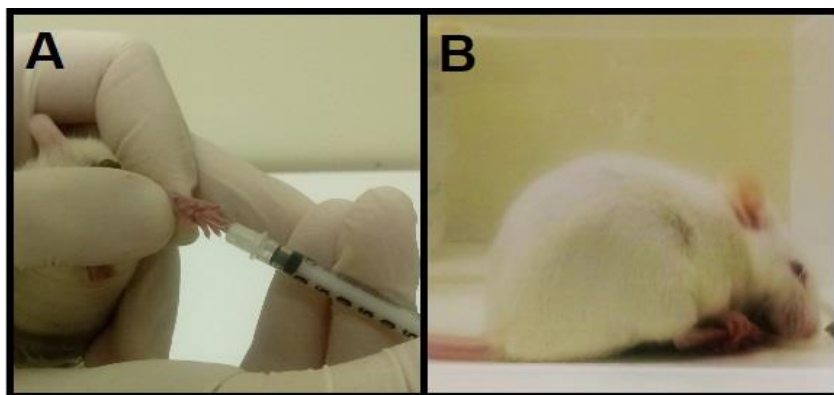
Todos os experimentos foram realizados com uma média de 5-8 animais por grupo. As avaliações foram cegas, ou seja, o avaliador não possuía conhecimento à respeito dos tratamentos e seus respectivos grupos, afim de eliminar possíveis propensões aos resultados.

4.3 Metodologia experimental

4.3.1 Nocicepção induzida por glutamato

Com o intuito de padronizar a dose a ser utilizada nos experimentos subsequentes e de confirmar dados prévios, utilizou-se o teste de nocicepção aguda induzida por glutamato. Os animais foram divididos em grupos experimentais: grupo veículo (controle, salina 10 mL/kg, i.g.) ou grupo tratado com EECI (10, 30, 100 ou 300 mg/kg, i.g). Cinquenta minutos após a gavagem, os animais foram dispostos, individualmente, em caixas de acrílico (30 x 30 x 20 cm), onde permaneceram por dez minutos, afim de ambientarem-se ao local. Decorrido o tempo, iniciou-se a administração, na pata traseira direita, de um volume de 20 μ L de uma solução de glutamato (20 μ mol, pH 7,0), em seguida, os animais retornam às caixas de acrílico onde permaneceram por mais 15 minutos. Nesse período, o comportamento nociceptivo, o qual correspondeu ao tempo em que o animal lambeu, mordeu ou sacudiu a pata que recebera a injeção, foi cronometrado (MEOTTI *et al.*, 2010).

Figura 6 – Nocicepção induzida por glutamato

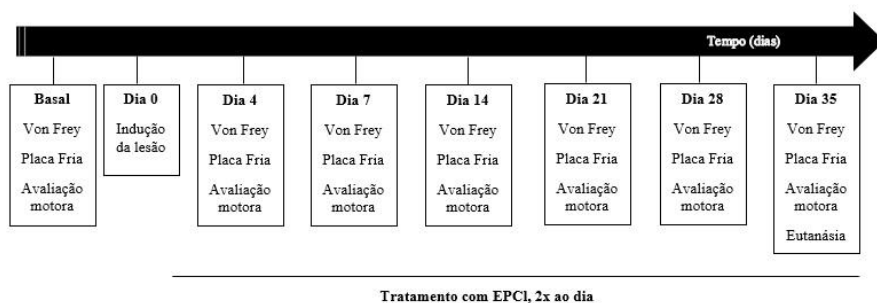


Legenda: Nocicepção induzida por glutamato. (A) injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol, pH 7,0) (B) resposta nociceptiva do animal (lamber, morder ou sacudir a pata) nos 15 min subsequentes à injeção. Fonte: a autora, 2017.

4.3.2 Representação esquemática e temporal do protocolo experimental do modelo de neuropatia periférica

As avaliações realizadas no modelo de neuropatia periférica induzida pelo esmagamento do nervo ciático, em camundongos, podem ser observadas na figura 7.

Figura 7 – Linha do tempo dos experimentos no modelo de neuropatia periférica induzida pelo esmagamento do nervo ciático em camundongos



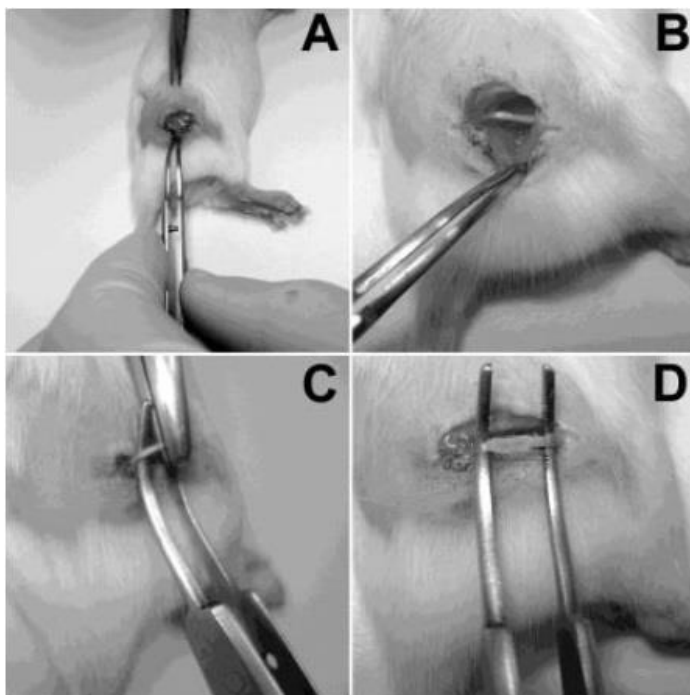
Legenda: A figura mostra quais foram as avaliações realizadas no modelo de neuropatia periférica induzida pelo esmagamento do nervo ciático, bem como os respectivos dias de sua realização. Fonte: a autora, 2017.

4.3.3 Modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC)

No dia anterior ao procedimento cirúrgico (esmagamento do nervo ciático), realizou-se uma análise das respostas basais dos animais, através dos filamentos de von Frey, utilizando o método de frequência (ver secção 4.3.4). Os animais que responderam mais que 20% ao estímulo foram excluídos do experimento. No dia do procedimento cirúrgico, os animais foram divididos, homoganeamente, em grupos, os quais foram i) falso-operado (FO) + veículo (salina 10 mL/Kg, i.g.), ii) FO + EECL (100 mg/Kg, i.g.), iii) ENC + veículo (10mL/Kg,i.g.); iv) ENC + EECL (10 mg/kg, i.g.) e v) ENC + EECL (100 mg/Kg, i.g.). Os animais foram previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) contendo xilazina (10 mg/Kg) e cetamina (80 mg/Kg) (BENTO *et al.*, 2008) e mantidos sob anestesia inalatória com 1–2% de Isoflurano a 100% de O₂, administrado por meio de uma máscara nasal. Após a verificação do estado de inconsciência do animal (através do pinçamento da cauda e das

pregas interdigitais), efetuou-se a tricotomia da área a ser operada. Em seguida, realizou-se uma incisão curvilínea na coxa direita do animal, iniciando acima e medialmente ao trocânter maior do fêmur e terminando próximo à fossa poplíteia, ao nível da inserção dos músculos isquiotibiais (Figura 8A). A exposição do nervo ciático foi conseguida após a divulsão dos músculos semitendíneos e reto femoral (Figura 8B). Com o auxílio de uma pinça hemostática não-serrilhada (adaptado de VAREJÃO *et al.*, 2004), foi realizado o esmagamento do nervo ciático direito por 30 segundos, apertando até o primeiro estágio da gramalheira da pinça, aproximadamente 10 mm acima da trifurcação do nervo (Figura 8C-D) (BRIDGE *et al.*, 1994). Em seguida, a pele foi reparada com dois pontos de sutura com fio absorvível (Ethicon, 4-0) e realizada a assepsia no local com anti-séptico (Povidine®). Após a cirurgia, os animais permaneceram próximos a uma fonte de calor até retornarem a deambular pela caixa, voltando então ao biotério do laboratório. A cirurgia nos animais dos grupos falso-operados contou apenas com a incisão da pele, além do procedimento anestésico. O tratamento com o EECl iniciou-se no dia seguinte ao procedimento cirúrgico, sendo o mesmo realizado duas vezes ao dia. As avaliações iniciaram no 4º dia após a lesão, sempre uma hora após a gavagem do extrato ou veículo, no período matutino.

Figura 8 – Indução da lesão por esmagamento do nervo ciático em camundongos



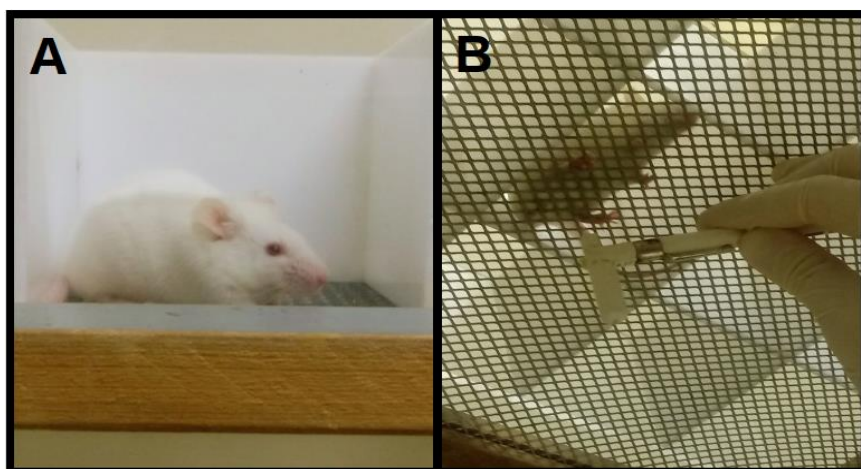
Legenda: Fotografias da indução da lesão por esmagamento do nervo ciático em camundongos. (A) Incisão cirúrgica; (B) exposição do nervo ciático; (C) esmagamento do nervo com a pinça hemostática não serrilhada por 30 segundos; (D) nervo após o esmagamento. Fonte: adaptado de Cidral-Filho, 2013.

4.3.4 Avaliação Sensorial Mecânica – Teste de von Frey

A hiperalgesia mecânica foi avaliada utilizando o teste com o monofilamento de von Frey (0,4 g) (VFH, Stoelting, Chicago, IL, EUA). Foi analisada a frequência de resposta de retirada da pata estimulada, frente a um estímulo mecânico como descrito previamente por Bobinski *et al.* (2011). Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico (9 x 7 x 11 cm) sem fundo, posicionada sobre uma plataforma com malha de arame fenestrado, permitindo o acesso à superfície plantar da pata dos animais (Figura 9A). O teste consistiu na aplicação do filamento de von Frey (durante 5 segundos) na pata posterior direita,

atendendo alguns critérios: i) a aplicação foi feita perpendicularmente à superfície plantar; ii) a pressão foi suficiente para proporcionar a curvatura do filamento, obtendo-se assim pressão total; iii) os animais foram avaliados quando as quatro patas estavam acomodadas sobre a tela de apoio e iv) a resposta de retirada da pata foi considerada positiva quando o animal removeu totalmente a pata da tela de apoio (Figura 9B). O resultado deste teste foi expresso em porcentagem de resposta frente a 10 aplicações do estímulo.

Figura 9 – Teste de von Frey

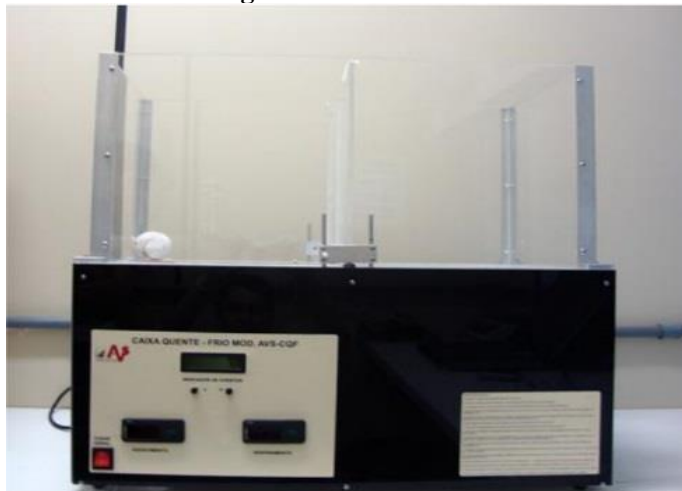


Legenda: avaliação da hiperalgesia mecânica (teste de von Frey). (A) Animal na plataforma de malha de arame fenestrado, (B) aplicação do filamento de von Frey (0,4g) na pata direita do animal (lesionada). Fonte: a autora, 2017.

4.3.5 Avaliação da hiperalgesia térmica – Teste da placa fria

Para avaliar a hiperalgesia térmica ao frio utilizou-se o teste da placa fria (Caixa quente – frio MOD. AVS-CQF, São Paulo, Brasil – Figura 10) conforme descrito anteriormente por Mika *et al.*, (2015), com algumas modificações. Os animais foram colocados individualmente em um aparato de acrílico (12 x 20 x 10 cm³) sobre uma placa resfriada continuamente à $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$, com tempo de corte de 120s. A hiperalgesia térmica ao frio foi avaliada considerando a latência de retirada da pata traseira direita.

Figura 10 – Placa Fria



Legenda: avaliação da hiperalgesia térmica. Aparato da placa fria. Fonte: a autora, 2017.

4.3.6 Avaliação do déficit motor – Índice Estático e Índice Funcional do Ciático

Para avaliação do déficit motor foi realizada a análise do Índice Estático do Ciático (IEC), e do Índice Funcional do Ciático (IFC), os quais foram obtidos através das gravações de fotos e de vídeo (câmera Logitech Webcam C922 Pro HD) da marcha do animal em uma pista confeccionada de MDF e vidro ($48 \times 4,5 \times 9$ cm) (Figura 11). As filmagens e fotos foram armazenadas em formato wmv e Jpeg, respectivamente e, posteriormente, isolaram-se quadros contendo os momentos de interesse para a análise do déficit funcional da marcha dos camundongos.

Os quadros de interesse foram exportados para o software “*Image Pro Plus*” versão 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, USA) para a mensuração dos parâmetros PL (comprimento da pegada, do inglês, *print length*) e TS (abertura total dos dedos, do inglês, *total spread of toes*) (Figura 12A-B-C-D), sendo que PL depende da ativação do músculo gastrocnêmio e TS é influenciado pelos músculos extensores e intrínsecos da pata, inervados por ramos do nervo ciático (BAIN *et al.*, 1989). Estes dados foram coletados do lado normal (não-operado) (NPL e NTS) e do lado experimental (operado) (EPL e ETS). Posteriormente, os fatores:

abertura total dos dedos (TSF) e comprimento da pegada (PLF) foram calculados pela seguinte fórmula:

$$TSF = ((\text{"ETS- NTS"}))/\text{"NTS"} \quad \text{e} \quad PLF = ((\text{"EPL- NPL"}))/\text{"NPL"}$$

O IEC foi calculado como descrito por Baptista *et al.* (2007) de acordo com a seguinte equação: $IEC = 101.3 \times TSF - 54.03 \times PLF - 9.5$.

O IFC foi calculado como descrito por Inserra *et al.* (1998) de acordo com a seguinte equação: $IFC = 118.9 \times TSF - 51.2 \times PLF - 7.5$.

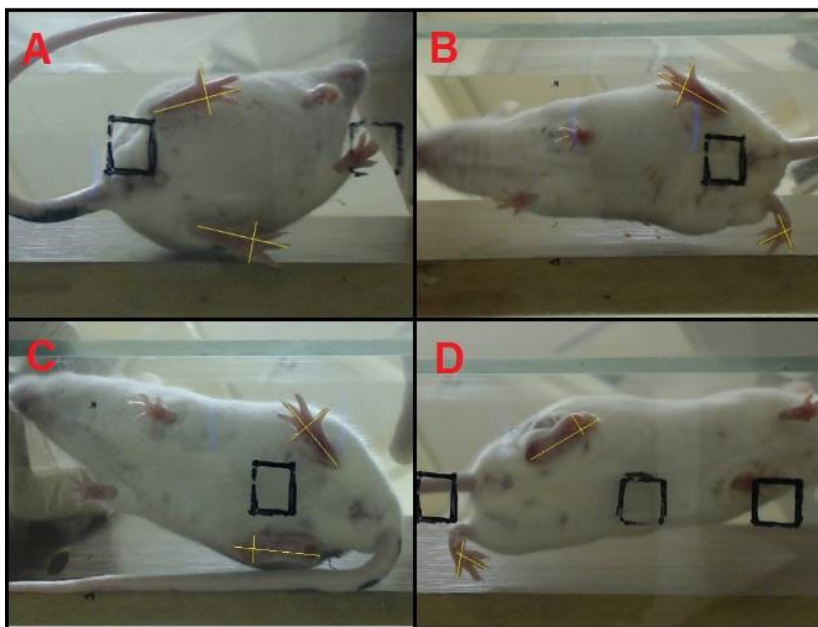
Os valores do IEC e IFC são negativos, variando de zero (0), que representa a função normal em ambos os lados, a menos cem (-100), que representa déficit funcional total. Deste modo, quanto mais próximo de zero melhor a função do nervo (BAIN *et al.*, 1989).

Figura 11 – Aparato para avaliação da capacidade locomotora



Legenda: aparato para o registro de fotos e vídeos da marcha do animal. Fonte: a autora, 2017.

Figura 12 - Medições do IEC e IFC de um animal falso-operado e um animal lesionado



Legenda: (A) medições do IEC de um animal falso-operado; (B) medições do IFC de um animal falso-operado (C) medições do IEC de um animal ENC (lesionado); (D) medições do IFC de um animal ENC (lesionado). Fonte: a autora, 2017.

4.4 Análise estatística

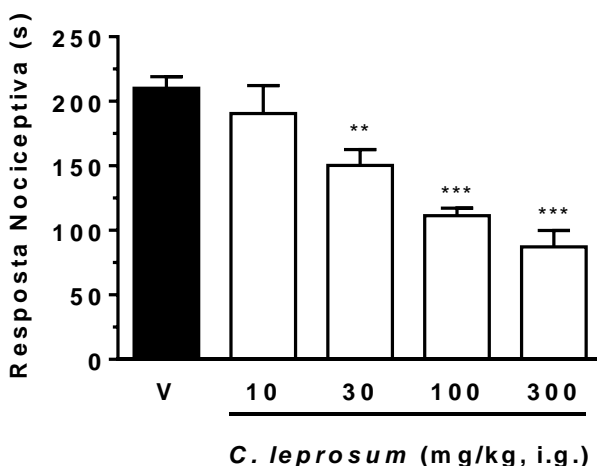
Os resultados foram analisados no software *Graph Pad Prism for Windows* versão 6.01 (Graph Pad Software, La Jolla, CA, EUA). Os testes realizados consistiram na análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do teste de Newman Keuls ou Bonferroni, respectivamente, para múltiplas comparações. Os resultados foram expressos como média + erro padrão da média (E.P.M.) dos dados analisados. Para todas as análises empregou-se um nível de significância para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito do EECl na nocicepção aguda induzida por glutamato

Os resultados apresentados na figura 13 demonstram que o EECl (30-300 mg/kg, i.g.) reduziu a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato, quando comparado ao grupo veículo, uma vez que foi capaz de minimizar o tempo de lambida, sacudida ou mordida da pata que foi submetida a injeção. A maior inibição foi obtida na dose de 300 mg/Kg ($59 \pm 6\%$), seguida da dose de 100mg/Kg (inibição máxima de $47 \pm 3\%$) e da dose de 30mg/Kg (inibição máxima de $28 \pm 6\%$). Desta forma, para os experimentos subsequentes, decidimos utilizar a dose de 10 e 100mg/Kg, afim de constatar que o efeito obtido é mesmo dependente da dose.

Figura 13: Efeito do tratamento com EECl sobre a nocicepção aguda induzida por glutamato

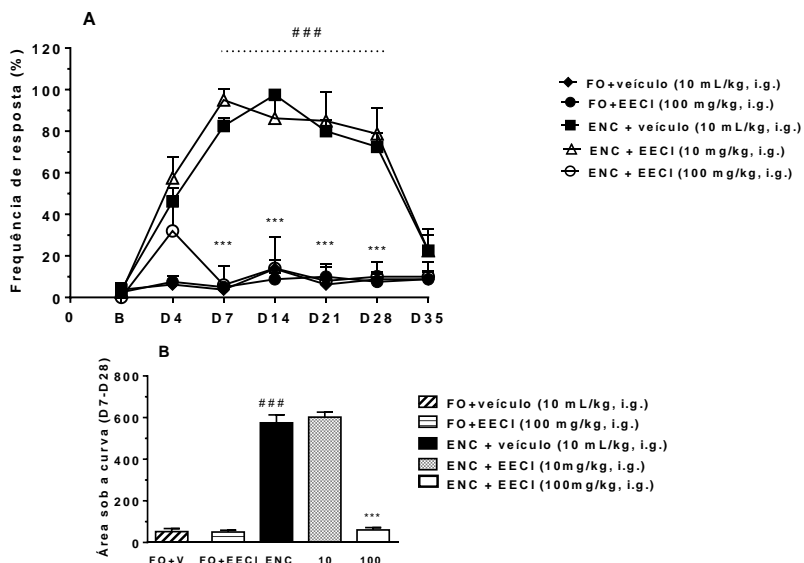


Legenda: Cada coluna representa a média de 7-13 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos denotam o nível de significância comparado com o grupo veículo (V). **p < 0,01; ***p < 0,001, usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.2 O efeito do EECl no modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC): hiperalgesia mecânica

O procedimento cirúrgico de esmagamento do nervo ciático produziu uma intensa e prolongada hiperalgesia mecânica, a qual foi verificada, através dos testes de von Frey, nos grupos ENC + veículo e ENC + EECl (dose de 10 mg/kg), se comparado ao grupo falso-operado tratado com veículo. A resposta hiperalgésica é caracterizada pelo aumento da frequência de retirada da pata lesionada frente ao estímulo nociceptivo, resposta observada do sétimo ao vigésimo oitavo dia após o procedimento cirúrgico (Fig. 14A). A completa restauração da função nociceptiva foi evidente 35 dias após a lesão nervosa (Fig. 14A). Além disso, não foi possível observar mudanças significativas nos valores da média da frequência de retirada da pata dos animais do grupo falso-operado durante o período experimental, indicando que a hiperalgesia surgiu como consequência do esmagamento do nervo ciático e não através do procedimento cirúrgico (incisão e sutura da pele) (Figura 14A). Os resultados observados na figura 14A ainda mostram que no grupo ENC+EECl (100 mg/kg, i.g.) houve redução da hiperalgesia mecânica, a qual é evidente nos dias 7, 14, 21 e 28, com uma inibição de 92 ± 5 a $94 \pm 5\%$, quando comparado ao grupo ENC tratado com veículo. A figura 14B mostra a área sob a curva do efeito do tratamento diário com EECl, indicando que a dose de 100 mg/kg é efetiva na redução da hiperalgesia mecânica.

Figura 14: Efeito do tratamento com EECl na hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de esmagamento do nervo ciático



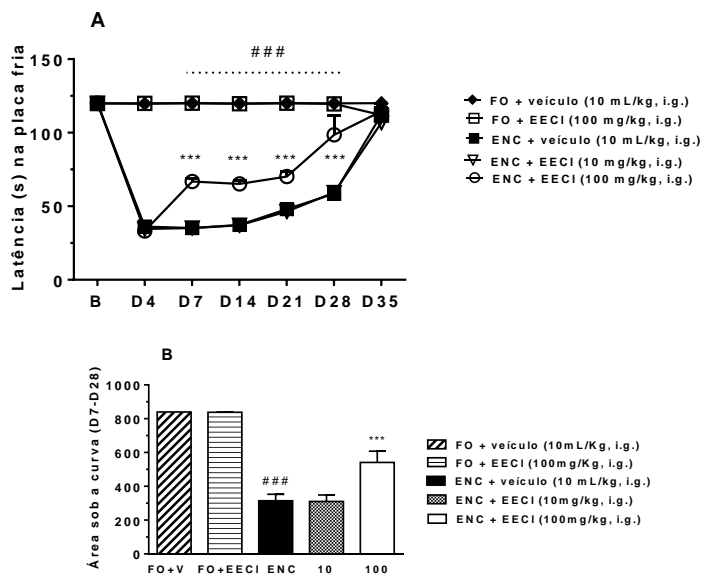
Legenda: O extrato de *C. leprosum* administrado intragastricamente diminuiu a hiperalgesia mecânica. O painel A apresenta o efeito da administração crônica com EECl sobre a hiperalgesia mecânica, enquanto o painel B apresenta a área sob a curva deste efeito. Cada coluna representa a média de 5-8 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos denotam o nível de significância comparado com o grupo ENC tratado com veículo. ***p < 0,001. O sustenido denota o nível de significância comparado com o grupo falso-operado tratado com veículo. ###p < 0,001 (ANOVA de uma via ou de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente). B: limiar de retirada basal; FO+V: falso-operado tratado com veículo; FO+EECl: falso-operado tratado com o extrato etanólico de *C. leprosum*; ENC: esmagamento do nervo ciático.

5.3 O efeito do EECl no modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC): hiperalgesia térmica

No 4º dia após a lesão do nervo observou-se uma significativa diminuição do limiar sensorial térmico ao frio nos animais. A hiperalgesia se manteve ao longo de 28 dias após a lesão, retornando aos valores basais

após o 35º dia (Fig. 15A). Estes resultados, juntamente com a avaliação da hiperalgesia mecânica, mostraram que o modelo adotado no presente estudo induziu um quadro nociceptivo nos animais correspondente à dor neuropática periférica em humanos (hiperalgesia mecânica e ao frio). Os resultados apresentados na figura 15A mostram que no grupo ENC+EECI (100 mg/kg, i.g.) houve uma evidente redução da hiperalgesia térmica nos dias 7, 14, 21 e 28, com uma inibição de 31 ± 5 a $90 \pm 1\%$, quando comparado ao grupo ENC tratado com veículo. A figura 15B, por sua vez, mostra a área sob a curva do gráfico A, evidenciando que a dose de 100 mg/kg foi efetiva na redução da hiperalgesia térmica

Figura 15: Efeito do tratamento com EECI sobre a hiperalgesia térmica induzida pelo modelo de esmagamento do nervo ciático



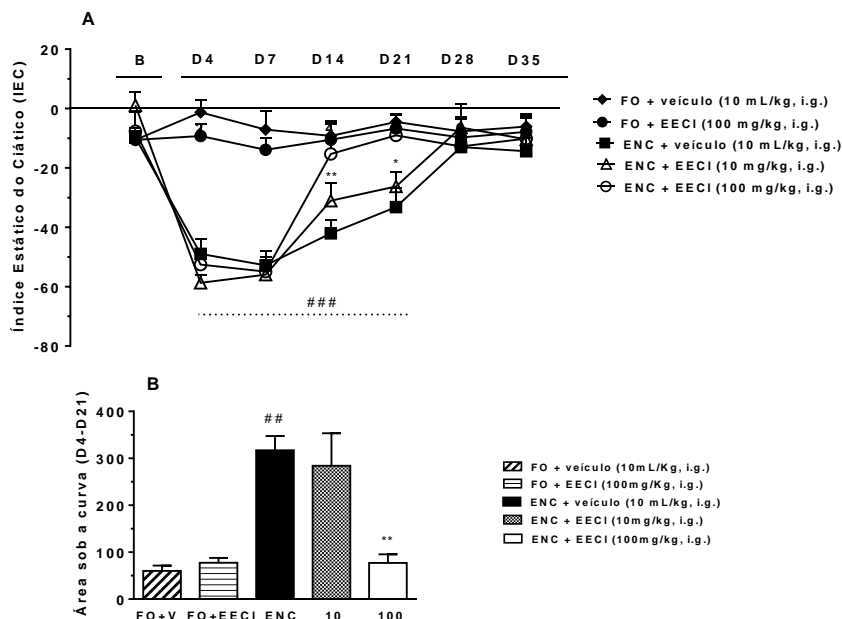
Legenda: O extrato de *C. leprosum* administrado intragastricamente diminuiu a hiperalgesia térmica ao frio. O painel A apresenta o efeito da administração crônica com EECI sobre a hiperalgesia térmica, enquanto o painel B apresenta a área sob a curva deste efeito. Cada coluna representa a média de 5-8 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos denotam o nível de significância comparado com o grupo ENC tratado com veículo. ***p < 0,001. O sustenido denota o nível de significância comparado com o grupo

(Continuação da legenda) falso-operado tratado com veículo. ### $p < 0,001$ (ANOVA de uma via ou de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente). B: limiar de retirada basal; FO+V: falso-operado tratado com veículo; FO+EECI: falso-operado tratado com o extrato etanólico de *C. leprosum*; ENC: esmagamento do nervo ciático.

5.4 O efeito do EECI no déficit motor no modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC): Índice Estático do Ciático (IEC)

Afim de avaliar a função motora através do IEC, 259 fotos das pegadas dos animais na pista de marcha foram analisadas, incluindo o período de avaliação pré-cirúrgica até a quinta semana pós-operatória. Observou-se que nos grupos falso-operados as médias do IEC (Figura 16A) permaneceram estáveis até a 5ª semana, próximo de -10, sendo este um valor considerado normal (ausência de déficit motor). Os valores do grupo ENC tratado com veículo ou com EECI na dose de 10 mg/kg foram significativamente mais baixos que o grupo falso-operado até o 21º dia pós-operatório. Estes resultados indicam a perda da função motora do membro inferior direito no grupo que teve o nervo ciático lesionado e recebeu apenas veículo (ENC + veículo), confirmando a indução da lesão pelo modelo adotado (Figura 16A). O déficit motor do grupo tratado com a dose de 100 mg/kg do EECI foi menor que os valores do grupo ENC tratado com veículo do 14º ao 21º dia após a lesão do nervo, apresentando melhora em torno de $81 \pm 3\%$ e $84 \pm 4\%$, respectivamente (Figura 16A). A figura 16B mostra a área sob a curva do gráfico A, evidenciando que a dose de 100 mg/kg foi efetiva no melhoramento do déficit motor dos animais.

Figura 16: Efeito do tratamento com EECl no déficit motor estático induzido pelo modelo de esmagamento do nervo ciático

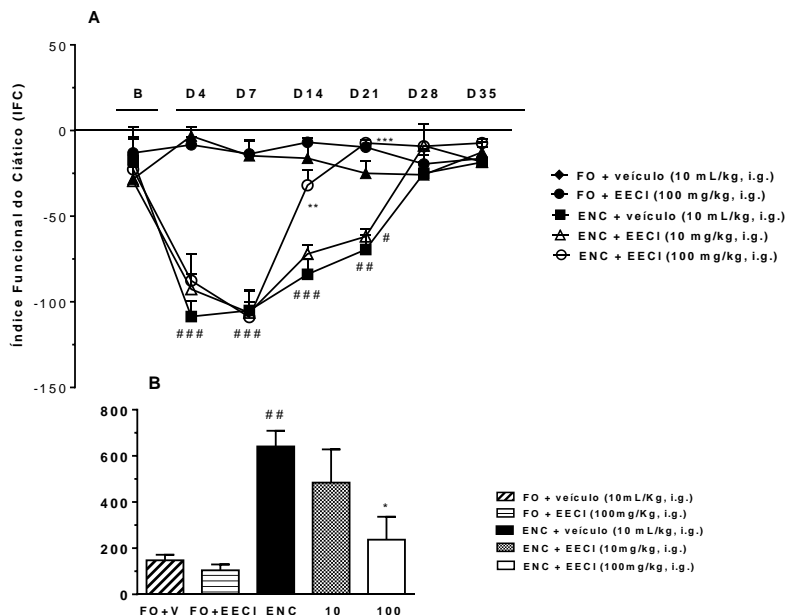


Legenda: O painel A apresenta o efeito da administração crônica com *C. leprosum* sobre a recuperação funcional motora, enquanto o painel B apresenta a área sob a curva deste efeito. Cada coluna representa a média de 5-8 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos denotam o nível de significância comparado com o grupo ENC tratado com veículo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. O sustenido denota o nível de significância comparado com o grupo FO tratado com veículo. ### $p < 0,01$ (ANOVA de uma via ou de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente). B: resposta basal funcional motora; FO+V: falso-operado tratado com veículo; FO+EECl: falso-operado tratado com o extrato etanólico de *C. leprosum*; ENC: esmagamento do nervo ciático.

5.5 O efeito do EECl no modelo de esmagamento do nervo ciático (ENC): Índice Funcional do Ciático (IFC)

Para avaliar a função motora através do IFC foram analisados 259 vídeos da marcha dos animais na pista de marcha, incluindo a avaliação pré-cirúrgica até a quinta semana pós-operatória. Observou-se que nos grupos falso-operados as médias do IFC (Figura 17A) permaneceram estáveis até a 5ª semana, próximo de -13, considerado um valor normal (ausência de déficit motor). Os valores do grupo ENC tratado com veículo ou com EECl na dose de 10 mg/kg foram mais baixos que o grupo falso-operado até o 21º dia pós-operatório. Os resultados indicam a perda da função motora do membro inferior direito no grupo que teve o nervo ciático lesionado e foi tratado com veículo (ENC + veículo) ou com a dose de 10 mg/kg, confirmando a indução da lesão pelo modelo adotado (Figura 17A). O déficit motor do grupo tratado com a dose de 100 mg/kg do EECl foi menor que os valores do grupo ENC tratado com veículo do 14º ao 21º dia após a lesão do nervo, apresentando melhora em torno de $77 \pm 1\%$ e 100%, respectivamente (Figura 17A). A figura 17B mostra a área sob a curva do gráfico A, evidenciando que a dose de 100 mg/kg é efetiva em reduzir o déficit motor dos animais.

Figura 17: Efeito do tratamento com EECl no déficit motor dinâmico induzido pelo modelo de esmagamento do nervo ciático



Legenda: O painel A apresenta o efeito da administração crônica com EECl sobre a recuperação funcional motora, enquanto o painel B apresenta a área sob a curva deste efeito. Cada coluna representa a média de 5-8 animais e as linhas verticais indicam o erro padrão da média (E.P.M.). Os asteriscos denotam o nível de significância comparado com o grupo ENC tratado com veículo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. O sustenido denota o nível de significância comparado com o grupo FO tratado com veículo. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (ANOVA de uma via ou de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente). B: resposta basal funcional motora; FO+V: falso-operado tratado com veículo; FO+EECl: falso-operado tratado com o extrato etanólico de *C. leprosum*; ENC: esmagamento do nervo ciático.

6. DISCUSSÃO

O alívio da dor é visto como um direito humano básico, envolvendo não somente uma questão clínica, mas também âmbitos éticos que dizem respeito a todos os profissionais de saúde, para que, em

conjunto, atuem visando a qualidade de vida do paciente (COUSINS *et al.*, 2000). Os processos de dor crônica, principalmente, são responsáveis por reduzir significativamente as condições para o bem-estar do indivíduo, gerando o afastamento do trabalho, além de gastos excessivos do sistema de saúde. A Associação Internacional para o Estudo da Dor afirma que, uma em cada três pessoas acometidas por dor crônica, é incapaz de manter um estilo de vida independente, devido à sua condição (SINISCALCO *et al.*, 2007). As mesmas deixam de se exercitar, realizar tarefas domésticas, manter atividades sociais e até mesmo de ter um sono normal, afetando o relacionamento com familiares e amigos e, por muitas vezes, levando a comportamentos depressivos (SINISCALCO *et al.*, 2007).

As dores crônicas de origem neuropática contribuem com esse cenário, tendo em vista que as lesões geradoras da dor são, muitas vezes incapacitantes. Além disso, evidências sugerem que pacientes com dor neuropática são menos responsivos a técnicas analgésicas convencionais, e, devido a isto, medicamentos como antidepressivos e opioides são frequentemente coadministrados na busca por um tratamento eficaz (RAJA *et al.*, 2002).

Atualmente, a procura por novas substâncias que possam ser aplicadas afim de garantir melhoras no conforto e qualidade de vida do paciente, continua sendo um dos grandes alvos da medicina moderna (DRAY, 2008). Dessa forma, o estudo de novas substâncias com potencial analgésico é fundamental no incremento de novos recursos que auxiliem no manejo da dor.

De acordo com Calixto (2000), apesar dos grandes avanços da medicina, os produtos naturais, principalmente os metabólitos secundários originados de plantas, contribuem significativamente para as terapias atuais. A OMS corrobora com o exposto, afirmando que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais como meio para atender as necessidades primárias de assistência médica.

As plantas sempre desempenharam, e continuam a desempenhar um papel fundamental na manutenção da vida humana, seja pelo fornecimento de alimentos, de energia térmica e ou de medicamentos (ALONSO, 1998). Calixto (2003) ressalta que o Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Esse grandioso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos tem, na atualidade, valor econômico-estratégico inestimável em diversas atividades, inclusive e principalmente no campo de desenvolvimento de novos fármacos.

A planta medicinal *Combretum leprosum* é utilizada como alternativa no tratamento das mais variadas condições, incluindo seu potencial cicatrizante, sedativo, anti-hemorrágico (FACUNDO *et al.*, 2005), antitussígeno, expectorante (AGRA *et al.*, 2007) e antiofídico (FERNANDES *et al.*, 2007). Esses efeitos podem surgir em decorrência da variedade de compostos encontrados na planta, tais como o ácido arjunólico, o ácido mólico, ácidos graxos, o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL), flavonoides glicosilados 3-O-metilquercetina, quercetinas, dentre outros (FACUNDO *et al.*, 2005).

Afim de constatar a relação dose/efeito da planta *C. leprosum*, realizamos um teste agudo de nocicepção induzida por glutamato. Os resultados obtidos indicam que a dose com melhor efeito foi a de 300mg/Kg, no entanto, a dose de 100mg/Kg indicou efeito semelhante, seguida da dose de 30mg/Kg. Esses dados reforçam o que já é descrito na literatura, contribuindo para a ampliação de evidências no desenvolvimento de novos fármacos. Sugere-se que tal atuação da *C. leprosum* seja em decorrência da interação de seus compostos com receptores glutamatérgicos, indicando um possível mecanismo de ação (PIETROVSKI *et al.*, 2006). No entanto, estes dados poderão ser confirmados através de um estudo mais detalhado à respeito da sua atividade sobre receptores específicos. Importante salientar que a dose de 10mg/Kg não mostrou-se efetiva nesse teste, no entanto, optamos por utilizá-la nos experimentos subsequentes afim de confirmar que o efeito obtido é dependente da dose.

O modelo de lesão por esmagamento do nervo ciático (ENC), utilizado neste trabalho, é amplamente empregado nas últimas décadas, com o intuito de, principalmente, avaliar o retorno da função motora. No entanto, a ênfase à dor neuropática decorrente dessa lesão é observada apenas em estudos recentes (COBIANCHI *et al.*, 2013). Desta forma, as evidências apontadas no decorrer deste trabalho sugerem que o modelo de lesão traumática adotado foi eficaz em reproduzir um quadro de dor neuropática, constatada pela presença de sintomas comuns na clínica, como hiperalgesia mecânica e térmica. Tais sintomas iniciaram-se na primeira semana após o procedimento cirúrgico e perduraram até o 28º dia, indicando o caráter crônico da doença.

Constatada a indução dos quadros neuropáticos, iniciaram-se testes para verificar o possível potencial terapêutico de *C. leprosum*. Os resultados obtidos demonstram que o EECl (100mg/Kg) foi capaz diminuir a frequência de respostas frente ao estímulo mecânico, bem como aumentar a latência em resposta ao estímulo térmico ao frio. Esses

aspectos foram observados do sétimo ao vigésimo oitavo dia após o procedimento cirúrgico. Possivelmente esses resultados são em virtude da interação do extrato com citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β , TNF- α e IL-6), citocinas envolvidas na inflamação gerada pela lesão nervosa, além da interação com canais TRPA1 (envolvidos em nocicepção à estímulos térmicos ao frio). Contudo, essas informações serão confirmadas após a análise da quantificação das concentrações de citocinas.

Adicionalmente, observou-se que o EECl (100mg/Kg) também foi capaz de promover melhoras significativas no déficit funcional motor induzido pela lesão de ENC, tal efeito foi observado do 14º ao 21º dia. Nossas hipóteses sugerem que o efeito se deu pela atuação do EECl na regeneração nervosa, todavia, poderemos confirmar esta inferência apenas através da análise histológica e morfométrica do nervo.

Embora os mecanismos moleculares que causam a dor neuropática sejam complexos e ainda não estejam totalmente esclarecidos, sabe-se que as lesões nervosas periféricas resultam em uma série de reações axonais, conhecida como degeneração Walleriana distal. Neste processo, células ativadas e recrutadas para o local da lesão liberam ATP, quimiocinas, bradicinina, PGs, NGF, e principalmente citocinas pró-inflamatórias. Estes neuromediadores periféricos sensibilizam o tecido nervoso adjacente e as fibras nervosas não lesionadas, facilitando a transmissão nociceptiva por tempo prolongado, exacerbando a hiperalgesia ou a alodinia (SCHOLZ; WOOLF, 2007). De fato, a sequência sincronizada de eventos periféricos leva ao processo de sensibilização central que é consequência da liberação de aminoácidos excitatórios (aspartato e glutamato), de peptídeos (substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina [CGRP]) e de neurotrofinas (NGF e BDNF) no corno dorsal da medula espinal. Considerado o exposto, sugerimos que o efeito de *C. leprosum* possa ser em decorrência da atuação em algum (ou alguns) destes mecanismos envolvidos na sensibilização periférica e central, no entanto, ainda são necessários mais estudos, afim de confirmar seu sítio (local) de atuação e, desta forma, fornecer bases seguras para o desenvolvimento de novos fármacos.

7. CONCLUSÃO

O conjunto de nossos resultados mostrou que o extrato etanólico das inflorescências de *Combretum leprosum* apresenta importante efeito antinociceptivo e neuroregenerador nos testes de nocicepção aguda, bem

como em testes sensoriais realizados após indução do modelo de neuropatia periférica. Desta forma, podemos inferir que o presente estudo apresenta bases farmacológicas iniciais para o desenvolvimento de novos fitoterápicos.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F., *et al.* Medicinal And Poisonous Diversity Of The Flora Of "Caririparaibano", Brazil. **J Ethnopharmacol.** V. 111, P. 383-95. 2007.
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, p.13-19, 1993.
- ALMEIDA, F.R.C., *et al.* Estudo Dos Efeitos Ansiolítico E Relaxante Muscular De Combretum Leprosum Mart. & Eicher. In: Xxxv **Congresso Brasileiro De Farmacologia E Terapêutica Experimental.** Águas De Lindóia, S.P. V. 1, P. 191. 2003.
- ANGEH, J.E., *et al.* Antimicrobial And Anti-Inflammatory Activity Of Four Known And One New Triterpenoid From Combretum Imberbe (Combretaceae). **J Ethnopharmacol.** V. 110, P. 56-60. 2007.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas.** Buenos Aires: ISIS Ediciones, 1998.
- ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 26, de 13 de Maio de 2014.** Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf Acesso em 04 de novembro de 2017.
- APKARIAN, A. V. *et al.* Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. **Eur. J. Pain.** v.9, p.463–484. 2005.
- BAIN, J.R., *et al.* Functional Evaluation Of Complete Sciatic, Peroneal, And Posterior Tibial Nerve Lesions In The Rat. **Plast Reconstr Surg.** V. 83, N. 1, P. 129-136. 1989.

BAPTISTA, A.F., *et al.* A new approach to assess function after sciatic nerve lesion in the mouse—adaptation of the sciatic static index. **J Neurosci Methods** 161:259–264. 2007.

BARON, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain: a clinical perspective. **Nat Clin Pract. Neurol.** v. 2, n. 2, p. 95-106, 2006.

BASBAUM, A. I. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell.** v. 139, n. 2, p. 267-284. 2009.

BASBAUM, A.I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: Kandel, E.R.; Schwartz, J.; Jessell, T., editors. **Princip of Neurosc.** New York: Appleton and Lange; p. 472-491. 2000.

BENTO, A.F., *et al.* The Selective Nonpeptide Cxcr2 Antagonist Sb225002 Ameliorates Acute Experimental Colitis In Mice. **J. Leukoc. Biol.** V.84, N.4, P. 1213-21. 2008.

BESSON, J.M. The Neurobiology Of Pain. **Lancet.** 353, 1610–1615. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos.** Brasília, 2001.

BRIDGE, P.M., *et al.* Nerve Crush Injuries - A Model For Axonotmesis. **Exp Neurol.** V. 127, N. 2, P. 284-290. 1994.

BOBINSKI, F. *et al.* Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience.**194:337–348. 2011.

BOBINSKI, F. Exercício físico de baixa intensidade na terapêutica da Dor neuropática e regeneração nervosa periférica: Estudo dos mecanismos de ação. **Tese de Doutorado – Pós Graduação em Neurociências.** Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2015.

BORSOOK, D. A future without chronic pain: neuroscience and clinical research. **Cerebrum,** v. 2012, p.7, May 2012.

BOUHASSIRA D., et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**. 2008 Jun;136(3):380-7. 2007.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol Res**, v. 33, n. 2, p. 179-89. 2000.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMPBELL, J.N. *et al.* Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury. **Pain**. v. 32, n. 1, p. 89-94. 1988.

CIDRAL-FILHO, F.J. Avaliação dos mecanismos fotobiológicos envolvidos na antinocicepção induzida pela terapia por diodo emissor de luz em Camundongos. 149p. **Tese de doutorado** - Pós-graduação em Neurociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

COBIANCHI, S., *et al.* Differential effects of activity dependent treatments on axonal regeneration and neuropathic pain after peripheral nerve injury. **Exp Neurol**. V. 240, p. 157-167. 2013.

COSTIGAN, M., *et al.* Neuropathic Pain: A Maladaptive Response Of The Nervous System To Damage. **Annu Rev Neurosci**. v. 32, S.N., P.1–32. 2009.

COUSINS, M.J.; POWER, I.; SMITH, G. Labat lecture: pain--a persistent problem. **Reg Anesth Pain Med**, v. 25, n. 1, p. 6-21. 2000.

DEVOR, M.; DE KONINCK, Y.; SOMMER, C. Underlying Mechanisms Of Neuropathic Pain. In: Pain 2014. Refresher Courses, 15th **World Congress On Pain**. Iasp Press. P. 187-198. 2014.

DRAY, A. Neuropathic pain: emerging treatments. **Br J Anaesth**, v. 101, n. 1, p. 48-58. 2008.

DWORKIN, R.H. *et al.* Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132, n. 3, p. 237-51. 2007.

ENGLAND, J.D., ASBURY, A.K. Peripheral Neuropathy. **Lancet**, 363: 2151-2161, 2004.

FACUNDO, V.A., *et al.* Triterpenes And Flavonoids From Combretum Leprosum. **Phytochemistry**, V.32, P.411-415, 1993.

FACUNDO, V.A., *et al.* Arjunolic Acid In The Ethanolic Extract Of Combretum Leprosum Root And Its Use As A Potential Multi-Functional Phytomedicine And Drug For Neurodegenerative Disorders: Anti-Inflammatory And Anticholinesterasic Activities. **J. Braz. Chem. Soc.**, V.16, (6b), P.1309-1312, 2005.

FERNANDES, F.F.A., *et al.* Evaluation Of Antiofidic Activity Of Combretum Leprosum Mart Fruitextract. In: Xxxix **Congresso Brasileiro De Farmacologia E Terapêutica Experimental**, Ribeirão Preto, S.P. P. 09.089, 2007.

FIELDS, H.L.; ROWBOTHAM, M.; BARON, R. Postherpetic neuralgia: irritable nociceptors and deafferentation. **Neurobiol. Dis.** 5:209–27. 1998.

FINNERUP, N.B. Treatment Of Neuropathic Pain: Opioids, Cannabinoids, And Topical Agents. In: Pain 2014 Refresher Courses, 15th **World Congress On Pain**. Raja S. N.; Sommer, C. L. Iasp Press, Washington D.C. P. 239-245. 2014.

FONSECA, M.C.M. Epamig pesquisa, produção de Plantas Medicinais para Aplicação no SUS. **Espaço para o produtor**. Viçosa. 2012.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.** v. 48(2), p.129-141, 1999.

FYHRQUIST, P. Traditional Medicinal Uses And Biological Activities Of Some Plant Extracts Of African Combretum Loefl., Terminalia L. And Pteleopsi Engl. Species (Combretaceae). **Dissertação Acadêmica**. Universidade De Helsinki, Helsinki, 2007.

HAN, Y.P., et al. Tnf-Alpha Stimulates Activation Of Pro-Mmp2 In Human Skin Through Nf-Kappa Bmediated Induction Of Mt1-Mmp. **J. Cell. Sci.** v. 114, N.1, P. 131–139. 2001.

HORINOUCI C.D., *et al.* Combretum Leprosum Mart. (Combretaceae): Potential As An Antiproliferative And Anti-Inflammatory Agent. **J Ethnopharmacol.** 145(1):311-9. 2013

IDE, C. Peripheral nerve regeneration. **Neurosci Res**, v. 25, n. 2, p. 101-21. 1996.

INSERRA, M.M., BLOCH, D.A., TERRIS, D.J. Functional indices for sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the mouse. **Microsurgery.**18(2):119-24. 1998.

JAIN, K. K. Current challenges and future prospects in management of neuropathic pain. **Expert Rev Neurother**, v. 8, n. 11, p. 1743-56. 2008.

JI, R.R.; WEN, Y.R. Neural–Glial Interaction In The Spinal Cord For The Development And Maintenance Of Nerve Injury-Induced Neuropathic Pain. **Drug Dev. Res.** v. 67, S.N., P. 331–338. 2006.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10. 2001.

KATERERE, D.R.; *et al.* Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, p. 81-88, 2003.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Arch of Vet Sci.** v. 13, 1, p. 1-12, 2008.

LAI, J. HUNTER, J. C.; PORRECA, F. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. **Curr. Opin Neurobiol**, London. v. 13, p. 291297. 2003.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto Protocol Of Iasp Basic Pain Terminology. **Pain**. V. 137, N. 3, P. 473-477. 2008.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353(9164), p.1607-1609, 1999.

LONGHI-BALBINOT, D.T., *et al.* Anti-Inflammatory Effect Of Triterpene 3 β , 6 β , 16 β -Trihydroxylup-20(29)-Ene Obtained From Combretum Leprosum Mart & Eich In Mice. **J Ethnopharmacol**. 26;142 (1):59-64. 2012.

LONGHI-BALBINOT, D.T., *et al.* Further Analyses Of Mechanisms Underlying The Antinociceptive Effect Of The Triterpene 3 β , 6 β , 16 β -Trihydroxylup-20(29)-Ene In Mice. **Eur J Pharmacol**. 25;653(1-3):32-40. 2011.

LONGHI-BALBINOT, D.T., *et al.* Spinal Antinociception Evoked By The Triterpene 3 β , 6 β , 16 β -Trihydroxylup-20(29)-Ene In Mice: Evidence For The Involvement Of The Glutamatergic System Via Nmda And Metabotropic Glutamate Receptors. **Eur J Pharmacol**. V. 623, 30-36. 2009.

LUNN, E. R.; BROWN, M. C.; PERRY, V. H. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. **Neuroscience**, v. 35, n. 1, p. 157-65, 1990.

MARTINI, N.; ELOFF, J.N. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from Combretum erythophyllum (Combretaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 62, p. 255-263, 1998.

MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role Of The Immune System In Chronic Pain. **Nature Rev. Neurosci**. 6, 521–530. 2005.

MACKINNON, S.E.; DELLON, A.L.; HUNTER, D.A. Histologic Assessment Of The Nerve Regeneration In The Rat. **Plast Reconstr Surg**. V. 75, N. 3, P. 384-388. 1985.

MARTINI, N.D.; KATERERE, D.R.; ELOFF, J.N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 207-212, 2004.

MARTYN, C.N., HUGHES, R.A.C. Epidemiology Of Peripheral Neuropathy. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.**, 62: 310-318, 1997.

MCGAW, L.J., *et al.* An Investigation On The Biological Activity Of *Combretum* Species. *J Ethnopharmacol.*v. 75, P. 45-50. 2001.

MEDEIROS, C.M., *et al.* Atividade Analgésica E Antiinflamatória Do Extrato Etanólico Da Raiz De *Combretum Leprosum* Mart. (Combretaceae) (06.032). In: **Xxxv Congresso Brasileiro De Farmacologia E Terapêutica Experimental**, Águas De Lindóia, S.P. V. 1. P. 134, 2003.

MELZACK, R. Pain and the neuromatrix in the brain. **J Dent Educ**, v. 65, n. 12, p. 1378-82. 2001.

MENESES, A.D., *et al.* Atividade Antiulcerogênica De *Combretum Leprosum* Mart &Eicher. In: **Xxxv Congresso Brasileiro De Farmacologia E Terapêutica Experimental**, Águas De Lindóia, S.P. V. 1. P. 193, 2003.

MEOTTL, F.C., COELHO, I., SANTOS, DOS, SANTOS, A.R. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **J. Pain** 11, 570–578. 2011.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2. ed. Seattle, Wash: IASP Press, 1994.

MIKA, J., *et al.* Effects Of Chronic Doxepin And Amitriptyline Administration In Naive Mice And In Neuropathic Pain Mice Model. **Neuroscience**, 294: 38–50. 2015.

MILLIGAN, E.D.; WATKINS, L.R. Pathological And Protective Roles Of Glia In Chronic Pain. **Nat Rev Neurosci** 10:23-36. 2009.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol.** v. 57, n. 1, p. 1-164. 1999.

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** v. 66, p. 355-474. 2002.

MORAES VIEIRA, E.B., et al. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. **J Pain Symptom Manage.** 44(2):239-51. 2012.

OJEWOLE, J.A. Cardiovascular Effects Of Mollic Acid Glucoside, A 1alphahydroxycycloartenoid Saponin Extractive From Combretum Molle R Br Ex G Don (Combretaceae) Leaf. **Cardiovasc J Afr.** v. 19, P. 128-134. 2008a.

OJEWOLE, J.A. Analgesic And Antiinflammatory Effects Of Mollic Acid Glucoside, A 1 Alphahydroxycycloartenoid Saponin Extractive From Combretum Molle R. Br. Ex G. Don (Combretaceae) Leaf. **Phytother Res.** V. 22, P. 30-35. 2008b.

OLAJIDE, O.A.; MAKINDE, J.M.; OKPAKO, D.T. Evaluation of the antiinflammatory property of the extract os Combretum micranthum G. Don. (Combretaceae). **Inflammopharmacology**, v.11, p. 293-298, 2003.

PIETROVSKY E.F., *et al.* Antinociceptive Properties Of The Ethanolic Extract And Of The Triterpene 3, 6, 16- Tridroxilup-20(29)-Eno (Tthp) Obtained From Flowers Of Combretum Leprosium In Mice. **Pharmacol Biochem Behav**; 83: 90-99, 2006.

PIRES, A.F. Atividade antinociceptiva de uma lectina de sementes de Canavalia brasiliensis MART. **Dissertação de Mestrado Acadêmico - Ciências Fisiológicas – Universidade Estadual do Ceará - UECE**, 2007.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais. OTERO, P. E. **São Paulo**: Interbook. p. 30-74. 2005.

POSSO, I.P.P.; PALMEIRA, C.C.A.; VIEIRA, E.B.V. Epidemiology of neuropathic pain. **Rev Dor**. São Paulo, 17(Supl 1):S11-4. 2016.

PURVES, D., *et al.* **Neurociências**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2010.

RAJA, S.N.; MD, J.A. Opioids versus antidepressants in postherpetic neuralgia: A randomized, placebo-controlled trial. **Neurology**. v. 59 no. 7 1015-1021. 2002.

ROCHA, A.P.C.; *et al.* Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 57(1), p. 94-105. 2007.

RODRÍGUEZ, F.J.; VALERO-CABRÉ, A.; NAVARRO, X. Regeneration And Functional Recovery Following Peripheral Nerve Injury. **Drug Discov. Today**. V.1, S.N., P.177-185. 2004.

ROGERS, C.B.; VEROTTA, L. Chemistry and biological properties of the African Combretaceae. In: Hostettman, K., Chinyanganga, F., Maillard, M., Wolfender, J.-L. (Eds.), Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of african Medicinal Plants. **University of Zimbabwe Publications**, Harare. 1996.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annu Rev Med**, v.49, p.123-33, 1998.

SCHAEFER, C., *et al.* Pain severity and the economic burden of neuropathic pain in the United States: BEAT Neuropathic Pain Observational Study. **Clinicoecon Outcomes Res**, v. 6, p. 483-96. 2014.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can We Conquer Pain? **Nat Neurosci**. 5 Suppl:1062-7. 2002.

SINISCALCO, D., *et al.* Role of reactive oxygen species and spinal cord apoptotic genes in the development of neuropathic pain. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 2, p. 158-66. 2007.

STELLWAGEN, D.; MALENKA, R.C. Synaptic Scaling Mediated By Glial Tnf-Alpha. **Nature**. V.440, N. 7087, P.1054-9. 2006.

TEIXEIRA, M.J., *et al.* Empiomas epidurais raquianos. **Arquivo Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 1, p. 35-51, 1982.

TEIXEIRA, M.J.; FIGUEIRÓ, J.A.B. Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. **São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr**, p.406, 2001.

TRUINI, A.; GARCIA-LARREA, L.; CRUCCU, G. Reappraising neuropathic pain in humans—how symptoms help disclose mechanisms. **Nat Rev Neurol**, v. 9, n. 10, p. 572-82. 2013.

VAN WYK, B.E.; VAN OUDTSHOORN, B.; GERICKE, N. Medicinal Plants of South Africa. **Pretoria: Editora Briza Publications**, 1997.

VAREJÃO, A.S., *et al.* Functional And Morphological Assessment Of A Standardized Rat Sciatic Nerve Crush Injury With A Non-Serrated Clamp. **J Neurotrauma**. V. 21, N. 11, P.1652-1670. 2004.

VEIGA, Jr. V. F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28(3), p. 519-528, 2005.

VIVIANI, B. Coculturing Neurons And Glial Cells. **Curr Protoc Toxicol**. Chapter 12. Unit 12.10. 2003.

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. Glial Activation: A Driving Force For Pathological Pain. **Trends Neurosci**. 24(8):450-455. 2001.

WOOD, J. N., *et al.* Voltage-gated sodium channels and pain pathways. **J Neurobiol**. Hoboken, v. 61, n. 1, p. 55-71, 2004.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9. 2000.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **J Pharmacolo Scie..** v. 101, p. 107-117. 2006.

ZIMERMANN, M. Ethical Guidelines For Investigations Of
Experimental Pain In Conscious Animals. **Pain**. V.16, N.2, P.109-110.
1983.